

**Charakterisierung rekombinant hergestellter Faktor-VIII-
Gen-Mutanten mittels Expressionsuntersuchungen in
CHO-Zellen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Katrin Klempau

aus der

Hansestadt Lübeck

Bonn, November 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: PD Dr. R. Schwaab

2. Referent: Prof. Dr. J. Höhfeld

Tag der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	4
1. Einleitung	6
1.1. Hämostase und Blutgerinnung	6
1.2. Hämophilie A	11
1.2.1. Klinik und Therapie	12
1.3. Das Faktor VIII Gen	14
1.3.1. Prozessierung	17
1.4. Das Faktor VIII Protein	20
1.5. Mutationen	23
1.6. Expression von rekombinanten Faktor VIII	27
1.7. Zielsetzung der Arbeit	29
2. Material und Methoden	31
2.1. Verwendetes Material	31
2.1.1. Chemikalien und Biochemikalien	31
2.1.2. Lösungen, Puffer, Nährmedien, Gele	32
2.1.3. Vektoren	32
2.1.4. Oligonukleotide	32
2.1.5. <i>E. coli</i> -Stämme	34
2.1.6. Zellen	34
2.2. Molekularbiologische Methoden	34
2.2.1. Plasmid – DNA – Präparation	34
2.2.2. Mutagenese	35
2.2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion	36
2.2.2.2. Enzymatische Spaltung des maternalen Stranges	37
2.2.2.3. Transformation	37
2.2.3. Umklonierung in Dh5 α -Zellen	37
2.2.4. Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	38
2.2.5. Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA-Konzentration	38

2.2.6. Sequenzierung	38
2.2.7. Lagerung von <i>E. coli</i> -Stock-Kulturen	40
2.3. Zellbiologische Methoden	40
2.3.1. Zellkultur	40
2.3.2. Transfektion von CHO-Zellen	41
2.3.3. Mikroskopische Kontrolle	43
2.3.4. Bestimmung der Zellzahl	43
2.3.5. Selektion	45
2.3.6. Herstellung eines stabilen Klons	45
2.3.7. Hochzucht	46
2.3.8. Induktion von CHO – Zellen	47
2.3.9. Lyse von CHO – Zellen	47
2.3.10. Herstellung und Lagerung von CHO – Stock – Kulturen	47
2.4. Biochemische Methoden	48
2.4.1. Bestimmung der FVIII – Aktivität	48
2.4.1.1. Electra – maschinell	48
2.4.1.2. Immuno – manuell	49
2.4.2. Bestimmung der FVIII – Antigen – Konzentration mittels ELISA	51
3. Ergebnisse	55
3.1. Etablierung der Technik	55
3.2. Herstellung der unterschiedlichen Expressionsvektoren	56
3.2.1. Ausgangsvektor pcDNA3	56
3.2.2. Mutagenese von pcDNA3fVIII	57
3.2.3. Sequenzanalyse	59
3.3. Expression des FVIII Wildtyps und der FVIII Mutanten in Zellkultur	62
3.4. Experimentelle und funktionelle Charakterisierung des FVIII-Wildtyps und der FVIII-Protein-Varianten	62
3.4.1. Aktivitätsbestimmung	63
3.4.2. Antigenbestimmung	67
3.4.3. Spezifische FVIII Aktivität	71
3.4.4. Sekretionsverhalten	74

4. Diskussion	78
4.1. Transfer der Methoden nach Bonn	82
4.2. Herstellung und Verwendung der Expressionsvektoren	83
4.3. Funktionelle Charakterisierung von Missense FVIII	
Proteinvarianten im Vergleich zum Wildtyp-Protein	84
4.3.1. Aktivität, Antigen und spezifische Aktivität	86
4.3.2. Sekretionsverhalten	89
4.4. Perspektiven	102
 5. Literaturverzeichnis	 105
 Danksagung	 128
 Lebenslauf	 129

Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
Abb.	Abbildungen
al.	altera (lat.: andere)
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BiP	Immunoglobulin bindendes Protein
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	copy desoxyribonucleic acid (mittels Reverser Transkriptase in DNA umgeschriebene RNA)
CHO	Chinesische Hamster Ovarzellen
COS	Affenierenzellen
d.h.	das heißt
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
etc.	et cetera (lat.: und anderes)
F	Farad (elektrische Kapazität)
Fa.	Firma
FBS	Fötales Kälber Serum
FI	Fibrinogen
FII	Prothrombin
FIIa	Thrombin
FIX	Faktor IX
FV	Faktor V
FVa	aktivierter Faktor V

FVIII	Faktor VIII
FVIII/Wt	FVIII Wildtyp
FVIII:Ag	Faktor FVIII-Antigengehalt
FVIII:C	Faktor VIII-Aktivität
FVIIIa	aktivierter Faktor VIII
FVIIIbdd	B-Domänen-deletierter FVIII
FX	Faktor X
FXa	aktivierter Faktor X
FXIII	Faktor XIII
FXIIIa	aktivierter Faktor XIII
g	Gramm
GA	Golgi-Apparat
gER	glattes Endoplasmatisches Retikulum
HAMSTeRs	Haemophilie A Mutation, Structur, Test, Resource Site
hFVIII	humaner Faktor VIII
inkl.	inklusive
IU	Internationale Einheit
kb	Kilo Basenpaare
kDa	Kilo Dalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
lat.	lateinisch
LB	Luria-Bertani-Medium
Lsg.	Lösung
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
mA	Milli-Ampere
mcs	multiple cloning site
min.	Minuten
ml	Milli-Liter
mRNA	messenger RNA
mU	Milli Units
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid

ng	nano Gramm (10^{-9})
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PL	Phospholipide
pNA	p-Nitroanilin
PTT	partielle Thromboplastinzeit
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
rFVIII	rekombinanter Faktor VIII
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
sek.	Sekunden
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
T _m	Schmelztemperatur
TSR	Template-Supressor-Reagenz
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
vWF	von-Willebrand-Faktor
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Zusammenfassung

Die Hämophilie A, die durch einen Defekt im Faktor VIII Protein hervorgerufen wird, ist eine X-chromosomal vererbte Gerinnungsstörung, die mit einer Prävalenz von 1 in 5000 männlichen Neugeborenen auftritt. Das FVIII-Gen ist auf dem X-Chromosom bei Xq28 lokalisiert und hat eine Größe von 186 kb, aufgeteilt auf 26 Exone. Das FVIII-Protein besteht aus 2332 Aminosäuren, angeordnet in der Domänenstruktur A1-A2-B-A3-C1-C2. Im Verlauf der Prozessierung und der Aktivierung wird die B-Domäne schrittweise herausgeschnitten und hat im aktiven Protein scheinbar keine Funktion. Dieses wird durch die Behandlungsmöglichkeit von betroffenen Patienten mit B-Domänen-deletierten FVIII-Präparaten bestätigt.

In ungefähr 13% der Fälle sind Missense-Mutationen für eine schwere Verlaufsform der Hämophilie A verantwortlich, wobei diese innerhalb der B-Domäne selten nachzuweisen sind. Es gibt Patienten, die eine Verminderung der Faktor-VIII-Aktivität vorweisen und bei denen nur eine Missense-Mutation in der B-Domäne gefunden wurde. Da die B-Domäne in der aktiven Form des Proteins nicht vorhanden ist, somit theoretisch keinen Einfluss auf die Aktivität hat, soll die Kausalität dieser Mutationen für einen hämophilen Phänotyp näher untersucht werden.

Hierzu wurden verschiedene Missense-Mutationen (Pro928Arg, Val993Leu, Glu1038Lys, Asp1241Glu, Arg1310Gly, Asn1441Lys, Leu1462Pro, Glu1579Asp und Ala1591Ser) in einen FVIII-Wildtyp-Expressionsvektor mittels in vitro Mutagenese eingefügt. Die so veränderten FVIII-Proteinevarianten wurden anschließend in Chinesischen Hamster Ovar Zellen exprimiert und mit den funktionellen Eigenschaften des Wildtypproteins verglichen. Bei 8 der 9 veränderten Varianten wiesen wir aktive Proteine im Medienüberstand der Zellen nach, die sich in den spezifischen Aktivitäten, sowie in der Sekretionsrate mehr oder weniger vom FVIII-Wildtyp unterschieden. Allerdings rechtfertigte keine dieser Proteinvarianten eine mittelschwere (Glu1038Lys und Asn1441Lys) oder schwere (Pro928Arg, Val993Leu, Glu1579Asp und Ala1591Ser) Verlaufsform der Hämophilie A.

Bei der Proteinvarianten Pro1462Leu könnte der Genotyp für den Phänotyp verantwortlich sein. In diesem Fall wurde im Zellkulturüberstand weder anhand der

Aktivitätstests noch des Antigen-ELISAs FVIII-Protein nachgewiesen. Im Zell-Lysat dagegen war ein aktives Protein vorhanden. Aufgrund des fehlenden Proteins im Medium und der somit nicht vorhandenen Sekretion, scheint an dieser Aminosäureposition ein für die Sekretionsfunktion kritischer Bereich zu liegen und würde damit das erste, in der B-Domäne lokalisierte, funktionelle Epitop darstellen.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Techniken können nun auf andere Gerinnungsfaktoren, die in unserer Arbeitsgruppe untersucht werden, übertragen und in der Routine für die Überprüfung der Kausalität von Missense-Mutationen eingesetzt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die B-Domäne (an den untersuchten Positionen) im aktiven Protein keine Rolle spielt. Die Bedeutung der B-Domäne liegt vermutlich in den Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, wie den Chaperonen, bei der Sekretion des Proteins.

1 Einleitung

1.1 Hämostase und Blutgerinnung

Die „Blutstillung“ wird als Hämostase bezeichnet und setzt sich aus einer Reihe komplexer Vorgänge zusammen. Das Blutgerinnungssystem lässt sich in 2 Abschnitte gliedern (Ackermann et al.):

1. primäre Hämostase
2. sekundäre Hämostase

Bei der *primären Hämostase* sind das Gefäßsystem einschließlich der Endothelzellen sowie die Thrombozyten beteiligt. Im Gefäßsystem kommt es bei einer Verletzung zu einer reflektorischen Kontraktion des verletzten Gefäßes und zu einem „Einrollen“ des offenen Endes. Dieses ist nur in Gefäßen mit muskulärem Anteil der Fall. Kapillaren, deren Wände aus Endothelzellen bestehen, reagieren mit einem Gefäßkollaps. Dabei werden Adrenalin, Noradrenalin und Serotonin aus den Thrombozyten der Gefäßwand freigesetzt. Als Folge kommt es zu einer Vasokonstriktion (Gefäßverengung). Dadurch wird der Blutstrom verringert und es entstehen Scherkräfte die die Anheftung der Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren an der Läsion erleichtern (Abb. 1). Es kommt zur Bildung des primären Plättchenpropfs (Übersicht: Hemker und Poliwoda, 1997).

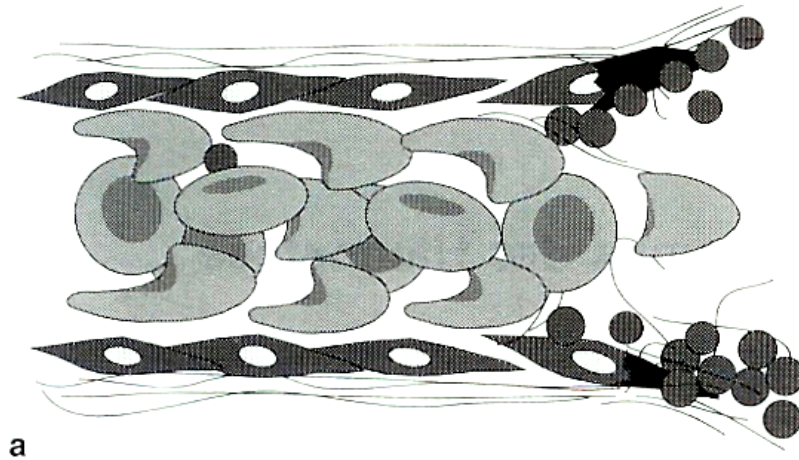


Abb. 1: Erste Phase der Blutstillung. Anhaftung von Thrombozyten an die Bindegewebsfasern

Die *sekundäre Hämostase* beinhaltet die Teilnahme plasmatischer Gerinnungsfaktoren. Um die physiologische „Abdichtung“ der Gefäßwand zu gewährleisten, muß der primäre Plättchenpropf stabilisiert werden (Abb. 2b). Durch die Umsetzung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin entsteht der sekundäre Thrombus (Fibrinthrombus). Hierbei wird der Thrombozytenthrombus durch ein festes Fibrinnetzwerk verstärkt, so dass Erythrozyten und Leukozyten eingeschlossen werden. Die Retraktion der Fibrinfäden zieht die Wundlippe wie einen Tabakbeutel fest zusammen (Abb. 2c).

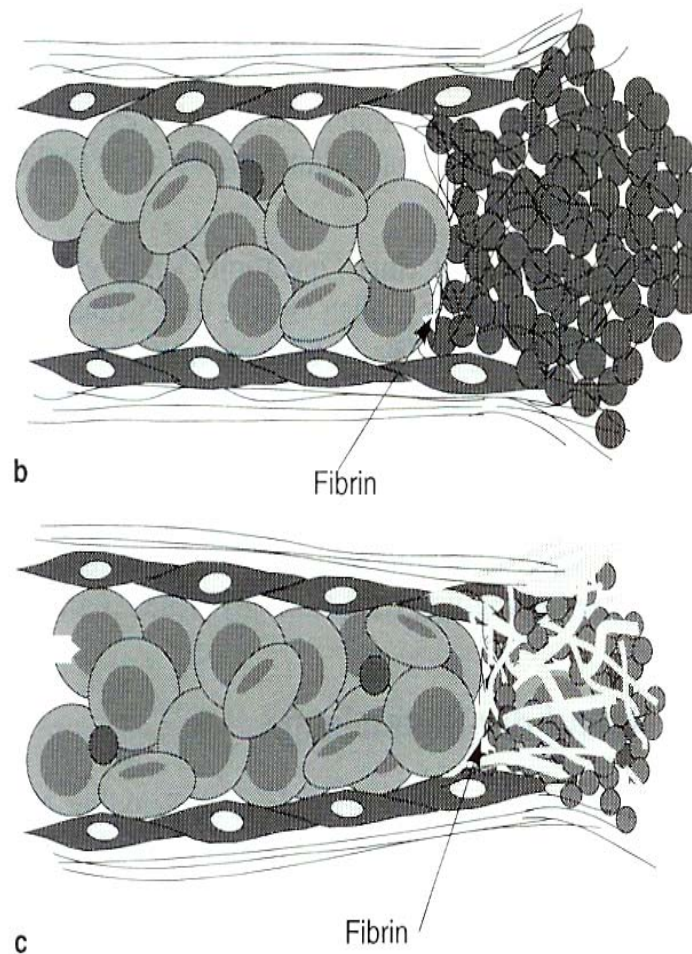


Abb. 2: Verschluss der Blutungsstelle. Bei der Teilabbildung b) erkennt man den plättchenreichen Abscheidungsthrombus mit Fibrinvernetzung und unter c) ist der endgültige Verschluss der Blutungsstelle durch Retraktion der Fibrinfäden zu erkennen

Die Wiederauflösung des Thrombus durch das Fibrinolyse-System ist erforderlich, damit die Gefäßwand einschließlich des Endothels regeneriert bzw. narbig ersetzt werden kann. Im Blut vorhandene Aktivatoren (u.a. Urokinase, FXIIa, Gewebsplasminogenaktivator) wandeln das inaktive Plasminogen in proteolytisch wirkendes Plasmin um. Plasmin wirkt enzymatisch und lysiert den Fibrinthrombus in lösliches Fibrin-spaltprodukt.

Thrombin ist das zentrale Gerinnungsenzym, dessen Bildung durch ein System positiver und negativer Rückkopplung gesichert wird, d.h. Thrombin beeinflusst seine eigene Bildung. Die Thrombinbildung erfolgt auf 2 Wegen:

1. exogenes System
2. endogenes System

Das *exogene System* (Extrinsic – System) ist physiologisch das wichtigere und wird bei einer Gewebsverletzung induziert. Durch freigesetztes Gewebsthromboplastin (Proteine und spezielle Phospholipide) wird Faktor VII zu Faktor VIIa aktiviert. Dieser wiederum aktiviert Faktor X zu Faktor Xa (Abb. 7).

Das *endogene System* (Intrinsic – System) wird bei einer Verletzung der Gefäßwand induziert. Zum Ablauf der Kaskade kommt es nach Kontakt mit negativ geladenen Fremdoberflächen wie (in vitro) z. B. Glas, Kaolin, Sulfatide etc., die Faktor XIIa adsorbieren. Durch den Wundflächenkontakt macht Faktor XII einen Strukturwandel durch, der ihn leicht aktiviert (Faktor XIIa). In dieser Form aktiviert er mit Kininogen als Helferprotein, Präkallikrein zu Kallikrein. Dieses aktiviert den Faktor XII. Der gebildete Faktor XIIa ist mit Kollagen und den Plättchen für die Aktivierung des Faktor XI zu Faktor XIa zuständig, der wiederum, in Verbindung mit Ca-Ionen den Faktor IX zu Faktor IXa aktiviert (Abb. 7). Faktor IX und Faktor VIII spielen eine zentrale Rolle im weiteren Verlauf bei der Aktivierung von Prothrombin (Faktor II), welches durch proteolytische Spaltung zu Thrombin wird. Der Cofaktor hierbei ist der aktive Faktor VIII (FVIIIa). Er unterstützt und beschleunigt (um das 300 000fache), zusammen mit Phospholipiden und Ca^{2+} , die Reaktion von Faktor IXa bei der Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa. Fehlt Faktor IX oder Faktor VIII oder ist eines dieser Proteine defekt, ist das endogene System ganz oder teilweise gestört (Übersicht: Barthels und Poliwoda, 1997).

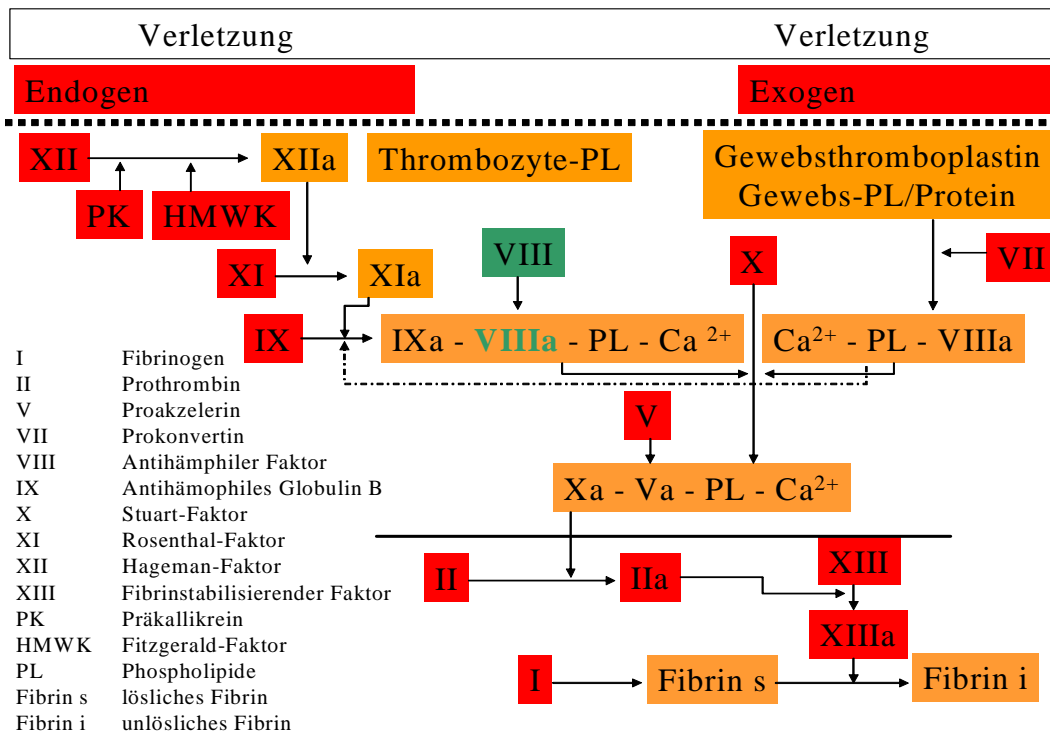


Abb. 3: Das Blutgerinnungssystem. Sekundäre Hämostase (Ackermann et al), a = aktivierter Faktor

Beide Reaktionswege (exogen und endogen) resultieren in der Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa. Sie sind verbunden über die sogenannte Jasso-Schleife, in der Faktor VII über Gewebethromboplastin Faktor IX aktiviert. Faktor Xa bildet in Kombination mit Ca^{2+} , Phospholipiden und Faktor V die Prothrombinase ($\text{Xa} - \text{Va} - \text{PL} - \text{Ca}^{2+}$), welche die Aktivierung von Prothrombin (II) zu Thrombin (IIa) katalysiert. Das Thrombin ist bei der Bildung von Fibrinpeptiden durch Fibrinogen (I) beteiligt und bei der Aktivierung des Faktor VIII. Durch den Zusammenschluß der Fibrinpeptide entsteht lösliches Fibrin, welches in Verbindung mit Ca^{2+} und Faktor XIIIa (durch Thrombin aktiviert) zu unlöslichem Fibrin wird.

Beide Systeme lösen im Plasma eine Reaktionskaskade aus, bei der in jedem Schritt ein inaktives Vorläuferprotein in seine aktive Form umgewandelt wird (Abb. 7). Dieses wiederum aktiviert ein bis zu diesem Zeitpunkt inaktives Protein (Übersicht: Barthels und Poliwoda, 1997).

1.2 Hämophilie A

Unter Hämophilie (griechisch Hämorrhagophilie) versteht man eine angeborene, lebenslang erhöhte Blutungsneigung, die durch eine verminderte oder fehlende Aktivität des Gerinnungsfaktors VIII (Hämophilie A) oder Gerinnungsfaktors IX (Hämophilie B) hervorgerufen wird. Beide Proteine sind zentrale Bestandteile der Gerinnungskaskade. Die Geschichte dieser Krankheit lässt sich historisch weit zurückverfolgen. Schon im 5. Jahrhundert gab es Berichte im Talmud babli (Werk der jüdischen Glaubenslehre) über Todesfälle durch Verbluten während der Beschneidung (Lawn und Vehar, 1986; Rosner et al., 1969). Im 19. Jahrhundert wurde der Begriff „Bluter“ definiert (Otto et al, 1803). 1820 gab es die ersten Theorien über den Vererbungsmodus durch Nasse. Acht Jahre später wurde der Begriff „Hämophilie“ durch Hopffs geprägt. Die erste Bluttransfusion bei einer Hämophilie fand, ohne Kenntnis über Blutgruppen, 1840 durch Lane statt (Übersicht: Lutze et al., 1999). Ende des 19. Anfang des 20. Jahrhunderts verbreitete sich die Hämophilie in europäischen Fürstenhäusern aufgrund der dort herrschenden blutsverwandten Heiraten (Fels et al., 1969).

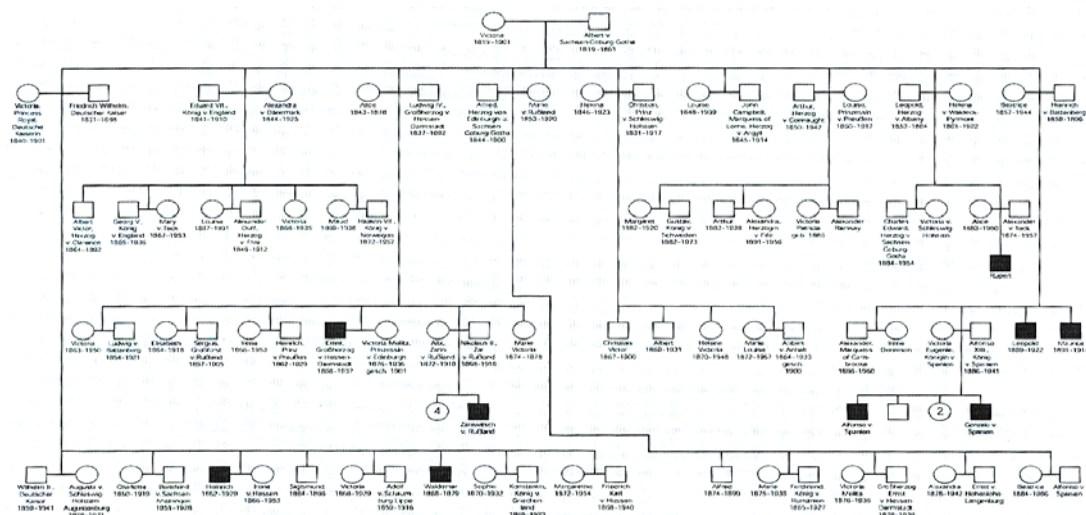


Abb. 4: Stammbaum europäischer Fürstenhäuser (Fels et al, 1969). Der Stammbaum zeigt den X-chromosomalen Erbgang der Hämophilie A. In der Regel sind nur Männer erkrankt, Frauen sind immer Konduktorinnen.

1893 erfand Wright den ersten Nachweistest für die Gerinnungsstörung unter Bestimmung der Gerinnungszeit. Erst 1937 isolierten Pohle und Tayler den Faktor VIII. 1947 entdeckte Pavlowsky, dass 2 Formen der Hämophilie existieren. Der erste Nachweistest zur Unterscheidung wurde 1952 von Macfarelane und Biggs entwickelt (Ingram et al., 1976).

Die heutigen Angaben über die Häufigkeit sind oft nicht einheitlich, weil es in isoliert lebenden Volksgruppen oder in Gebieten mit einer hohen Rate von Verwandtenehen zu einer Häufung der Hämophilie kommt. Außerdem gibt es eine uneinheitliche Diagnostik bzw. Einbeziehung in die Statistik, wovon besonders die leichteren Erkrankungsfälle betroffen sind. Bei der Hämophilie A existieren Angaben von 1 Betroffenen auf 5000 männlicher Neugeborener bis 1 Betroffener auf 10 000. 50% der Fälle sind der schweren Form zugeordnet. Bei der Hämophilie B gibt es Angaben von 1 Betroffener auf 30 000 bis 1 Betroffener auf 50 000 männlicher Neugeborener.

1.2.1 Klinik und Therapie

Die Hämophilie A ist eine angeborene plasmatische Gerinnungsstörung mit einer verminderten oder fehlenden Faktor VIII – Aktivität bei normaler bis erhöhter Konzentration des von-Willebrand-Faktors. Die Hämophilie A zeigt kein einheitliches Krankheitsbild, da die Auswirkungen auf den klinischen Verlauf abhängig vom Schweregrad der Erkrankung sind. Die Aktivität des Faktor VIII ist bei jedem Patienten unterschiedlich stark herabgesetzt, bei Blutsverwandten aufgrund des gleichen genetischen Defektes (Punktmutation, Inversion etc.) aber in der Regel gleich. Die Gerinnungsaktivität ändert sich beim einzelnen während seines Lebens nicht. Die Blutungsneigung ist vom Schweregrad der Hämophilie A abhängig, der wie folgt eingeteilt wird:

Normal	:	Faktor VIII Aktivität 50 – 150 %
leichte Form / Subhämophilie	:	Faktor VIII Aktivität 25 – 50 %
milde Form	:	Faktor VIII Aktivität 5 – 24 %
mittelschwere Form	:	Faktor VIII Aktivität 1 – 4 %
schwere Form	:	Faktor VIII Aktivität < 1 %

In der Regel wird die Diagnose bei den Patienten bereits im Säuglingsalter gestellt. In Einzelfällen, insbesondere bei den leichteren Verlaufsformen, erfolgt die Diagnose erst im Erwachsenenalter. Hauptsächliche Fehlerquelle in der Bestimmung von zu hohen bzw. pseudonormalen Faktor VIII – Aktivitäten sind insbesondere:

1. Streßsituationen → erhöhter Faktor VIII – Spiegel
2. Leberleiden → erhöhter Faktor VIII – Spiegel
3. Entzündungen und Neoplasien
4. Schwangerschaft

Wegen der rezessiv X-chromosomal gebundenen Vererbung sind fast ausschließlich nur Männer betroffen. Eine Überträgerin (Konduktorin) hat in der Regel nur eine leicht verminderte Faktor VIII – Aktivität, die häufig unentdeckt bleibt. Oft wird eine Erkrankung nur anhand der Familiengeschichte entdeckt. In seltenen Fällen kann die Faktor VIII – Aktivität auch bei Konduktorinnen erheblich vermindert sein und das Ausmaß der Krankheit eine mittelschwere bis schwere Verlaufsform erreichen. Man spricht dann von „extremer Lyonisierung“ (Graham et al, 1975). Patienten mit einer schweren Hämophilie A leben unbehandelt ständig mit einer Blutungsgefahr, die schon bei Bagateltraumen (u. a. auch Zahnextraktionen) besteht. Durch wiederholtes Einbluten in Knie-, Ellenbogen- und Sprunggelenken kann es zu Verkrüppelungen kommen, die bis zu Gelenkversteifungen und Lähmungen führen können. Bereits bei der mittelschweren Hämophilie A kommen solche extremen Blutungen kaum noch vor, der Patient ist häufig sogar klinisch unauffällig. Probleme treten bei den Betroffenen meist „nur“ bei Operationen, Unfällen oder bei Zahnarztbesuchen auf. Hinweis auf den milden Faktormangel ist eine leichte Verlängerung der PTT (partielle Thromboplastinzeit: Abnormalitäten und Verminderungen verschiedener Gerinnungsfaktoren in der Blutgerinnung verursachen eine Verlängerung der PTT). Doch nicht nur Menschen können von der

Hämophilie A betroffen sein, sondern auch Tiere. Eine natürliche Hämophilie A beim Hund wurde als Tiermodell zu wissenschaftlichen Zwecken genutzt (Graham et al, 1949; Webster et al, 1974).

Die Therapie der Hämophilie A wird über die Substitution von Faktor VIII Präparate ermöglicht, allerdings sind die Kosten dieser Behandlung sehr hoch. Obwohl die Substitutionstherapie eine normale Lebenserwartung und Bewegungsfreiheit durch die Verhinderung spontaner Gelenkblutungen bietet, ist die Lebensqualität der Betroffenen durch das mehrmalige Spritzen der Faktorkonzentrate pro Woche stark eingeschränkt.

1.3 Das Faktor VIII Gen

Das Faktor VIII Gen ist im Vergleich zu anderen humanen Genen sehr groß und am telomeren Ende auf dem langen Arm des X –Chromosoms bei Xq28 nahe des Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase- und des Aldehyddehydrogenase – Gens lokalisiert. Es hat eine Größe von 186 kb und ist in 26 Exons unterteilt (s. Abb. 5). Dieses entspricht ungefähr 0,1% des gesamten X-Chromosoms. Die Orientierung des Gens ist mit dem 5'-untranslatierten Ende in Richtung des Telomers. Die Größe der Introns des Gens variieren von 0,2 kb (Intron 17) bis 32 kb (Intron 22). Von den 25 Introns sind 6 länger als 14 kb. Im Intron 22 (IVS22) finden sich 2 nicht Faktor VIII Gene (F8A und F8B), die über einen bidirektionalen Promotor kontrolliert werden. F8A besteht nur aus einem Exon mit einer Größe < 2kb, welches in die entgegengesetzte Richtung transkribiert wird wie der Faktor VIII. Da dieses Gen auch im Faktor VIII der Maus zu finden ist, wird vermutet, dass es eine bislang noch unbekannte Funktion besitzt. 400 kb in telomerischer Richtung vom Faktor VIII entfernt, liegen noch 2 Kopien des F8A Gens, die in der gleichen Transkriptionsrichtung gelesen werden wie das Faktor VIII Gen. F8B, das aktive Gen im Intron 22, besteht ebenfalls nur aus einem Exon, das an die Exone 23 – 26 des Faktor VIII Gens anschließen kann. Es wird in die gleiche Richtung transkribiert wie das Faktor-VIII-Gen. Das Ergebnis ist ein kurzes Protein, bestehend aus 210 Aminosäuren.

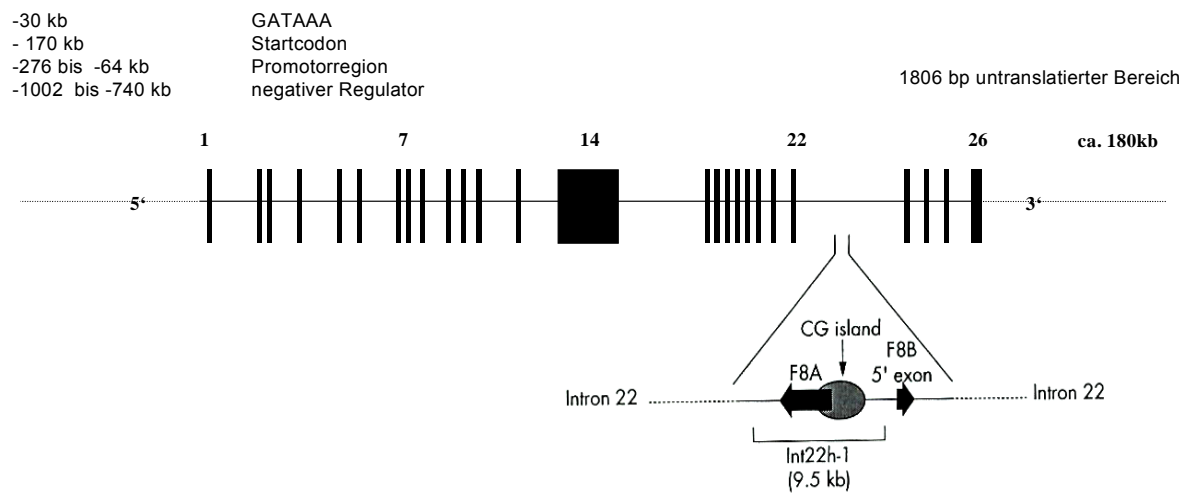


Abb. 5: Das Faktor VIII Gen. Die Exons sind als schwarze, senkrechte Striche dargestellt. Hervorgehoben ist das Intron 22 mit seinem hohen CG Gehalt und den Genen F8A und F8B

Die Größe der Exons variieren in der Regel zwischen 69 und 262 bp (Tab. 1). Die Ausnahme bilden Exon 26 mit nur 148 bp und Exon 14 mit 3,1 kb.

Exon	Größe(bp)	Intron	Größe (kb)
1	313	1	22,9
2	122	2	2,6
3	123	3	3,9
4	213	4	5,4
5	69	5	2,4
6	117	6	14,2
7	222	7	2,6
8	262	8	0,3
9	172	9	4,8
10	94	10	3,8
11	215	11	2,8
12	151	12	6,3
13	210	13	16,0
14	3106	14	22,7
15	154	15	1,3
16	213	16	0,3
17	229	17	0,2
18	183	18	1,8
19	117	19	0,6
20	72	20	1,6
21	86	21	3,4
22	156	22	32,4
23	145	23	1,4
24	149	24	1,0
25	177	25	22,4
26	148		

Tab. 1: Exons und Introns. Auflistung der Größen für die Exons und Intron des humanen Faktor 8 Gens

Der Transkriptionsstartpunkt befindet sich 170 kb vor dem Startcodon (ATG, Met) (Gitschier et al, 1984). Ein 1,2 kb großer Bereich vor dem 5'-Ende (-279 bis -64) ist als Promotorregion identifiziert worden (Figueiredo und Brownlee, 1995). Diese Region besitzt verschiedenen Bindungsstellen, u.a. für den in der Leber angereicherten Transkriptionsfaktor C/EBP_{α+β} (McGlynn et al, 1996). Die 30 bp vor dem 5'-Ende befindliche Sequenz GATAAA, die ähnlich der „TATA-Box“ ist, hat nur einen geringen Einfluß auf die Promotoraktivität (Figueiredo und Brownlee, 1995). In der Region -740 bis -1002 wird ein negativer Regulator vermutet, da das Entfernen dieser Basen die Aktivität des FVIII – Promotors erhöht (McGlynn et al, 1996). Am 3'-Ende nach dem Stop-Codon (TGA) befindet sich, nach 1806 bp untranslatierten Bereich, der Poly-A-Bereich (AATAAA).

1.3.1 Prozessierung

Faktor VIII wird hauptsächlich in den Hepatozyten der Leber, aber auch in Lymphknoten, Gehirn und in geringen Mengen in Pankreas, Nieren und Plazenta (Wion et al, 1985) synthetisiert. In anderen Körperzellen z. B. Leukozyten wurde ebenfalls eine geringe Menge des reifen Transkripts nachgewiesen. Sie werden als ektopisch bzw. illegitim bezeichnet, da sie aufgrund ihrer geringen Konzentration oft nur über reverse Transkription nachweisbar sind (Naylor et al, 1991; Chelly et al, 1989; Kaplan et al, 1992).

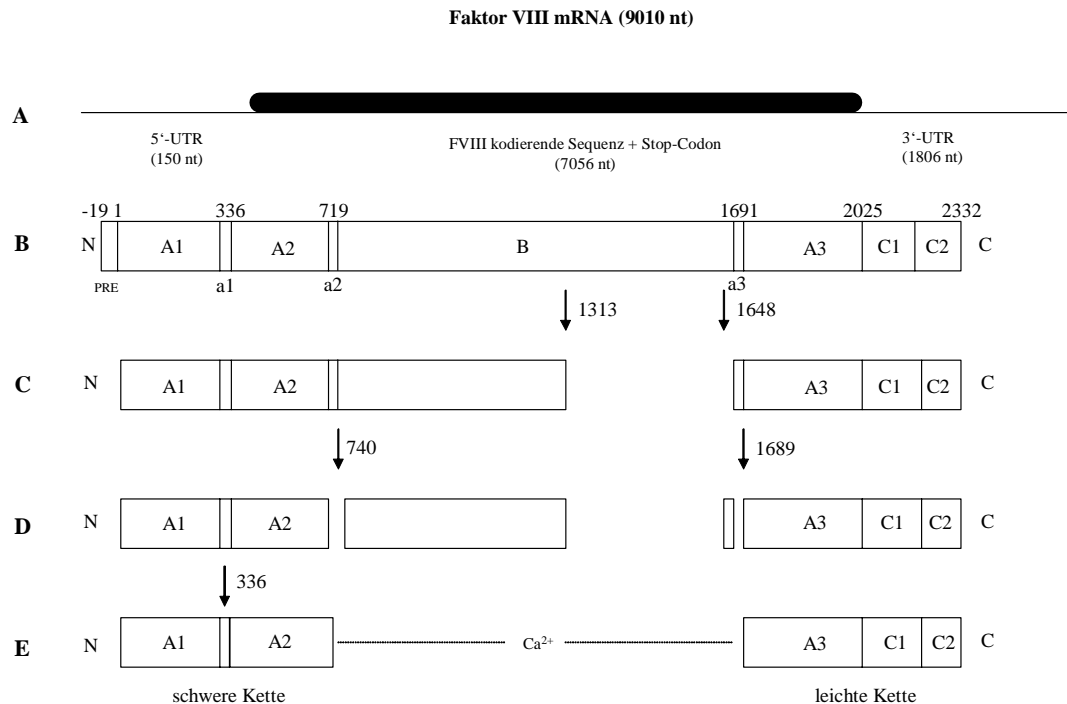


Abb 6.: Struktur der FVIII mRNA und Prozessierung des FVIII Proteins. A) FVIII mRNA, B) FVIII Protein im ER, C) FVIII Protein nach Sekretion im Golgi Apparat, die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Thrombinschnittstellen, D) und E) Aktivierung des FVIII Proteins im Plasma durch Thrombin

Die 26 Exone werden zu einem 9010 Nukleotid großem mRNA – Transkript zusammen gespleißt (Gitschier et al, 1984). Aus diesem wird eine Vorstufe des Faktor VIII Proteins synthetisiert, welches insgesamt 2351 Aminosäuren umfaßt (-19 bis 2332). Bei der Translokalisierung dieses Transkriptes in das Endoplasmatische Reticulum (ER) wird ein Signalpeptid von 19 Aminosäuren abgespalten (Vehar et al, 1984), so dass das noch unreife Protein jetzt 2332 Aminosäuren umfaßt. Es läßt sich in 3 unterschiedliche Domänen aufteilen, die in der Reihenfolge A1:A2:B:A3:C1:C2 vorliegen (Abb. 6). Im rauhen Endoplasmatischen Reticulum erfolgt die Glykosylierung des Faktor-VIII-Proteins an 25 Asparagin-Seitenketten. 19 davon liegen in der B-Domäne (Wood et al, 1984). Ein großer Teil des Faktor-VIII-Proteins im rauhen ER bindet an ein 78kD großes Glukose-regulierendes Protein (GRP78), auch als Immunoglobulin bindendes Protein (BiP) bekannt. Da gebundenes Faktor-

VIII-Protein nicht zum Golgi-Apparat weitergeleitet wird, wird vermutet, dass diese Proteine falsch gefaltet sind oder sich gerade im Faltungsprozess befinden (Dorner et al, 1987, 1990). BiP kann ATP binden und hat eine ATPase Aktivität. Dieses bewiesen Tests von isoliertem Faktor-VIII – BiP – Komplex. Es ist daher möglich, dass die Faktor VIII Sekretion von der ATP-Konzentration in der Zelle abhängig ist (Kassenbrock et al, 1989; Kaufmann, 1992). Im Golgi-Apparat wird das Faktor-VIII-Protein in der B-Domäne bei Arg¹³¹³ – Ala¹³¹⁴ und bei Arg¹⁶⁴⁸ – Glu¹⁶⁴⁹ von 2 Proteasen geschnitten (Kaufmann, 1992), so dass eine 200 kD große schwere Kette und eine 80 kD große leichte Kette entstehen (Abb 6). Im Golgi-Apparat finden auch weitere Modifizierungen der glykosylierten Stellen, Anhang von Kohlenhydratketten an Serin- und Threonin – Resten in der B-Domäne und Anhang von Schwefel an 6 spezifischen Tyrosinresten in der leichten wie schweren Kette statt.

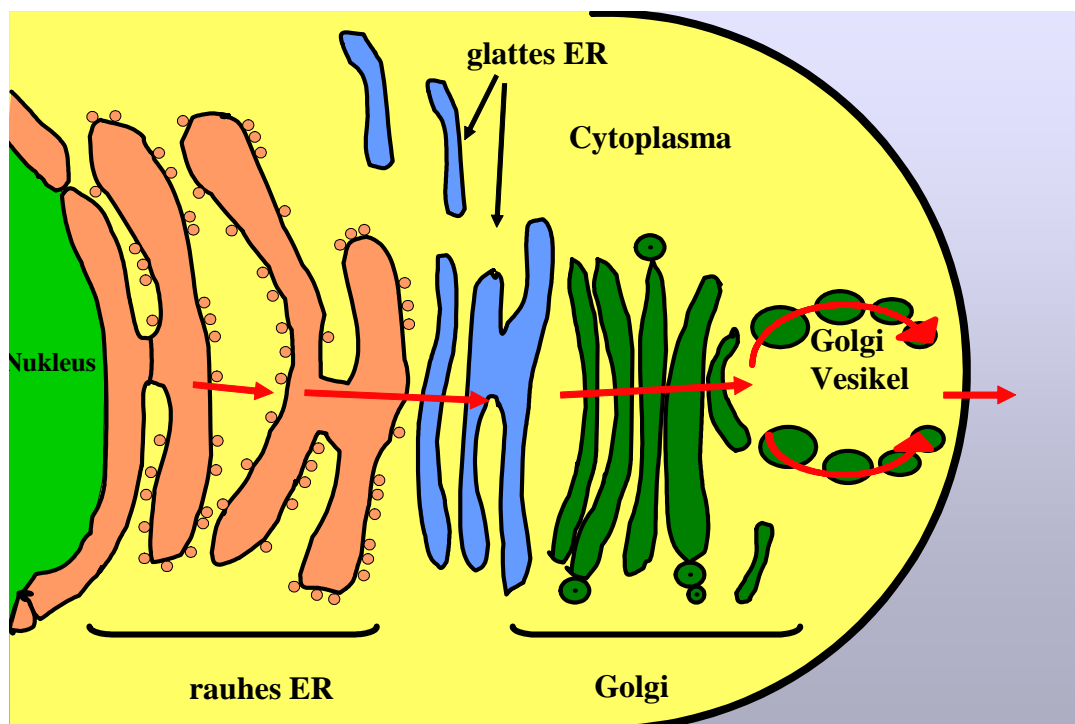


Abb. 7: Der Weg des FVIII Proteins durch die Zelle. Das FVIII Protein wird über das ER und den Golgi Apparat in seine tertiäre Struktur gefaltet und über Golgi-Vesikel aus der Zelle geschleust.

Nach Sekretion des heterodimeren Faktor-VIII-Proteins aus der Zelle in die Blutbahn wird das Protein durch den von-Willebrand-Faktor (Konzentration im Plasma 10 ng/ml) stabilisiert. Im Blut liegt das Faktor VIII Protein in einer Konzentration von 100 – 200 ng/ml vor (Wood et al, 1984; Hoyer et al, 1994). Ohne Stabilisierung sinkt die Halbwertszeit des Faktor-VIII-Proteins im Plasma von 12 auf nur 1 Stunde (Vlot et al., 1996). Der vWF bindet an das Aminoende der leichten Kette zwischen Aminosäure 1673 – 1684, in der sich eine aus sauren Aminosäuren zusammengesetzte Region (acid region, ar) befindet (Kaufman, 1992b). Für die von-Willebrand-Bindung sind ebenfalls die sulfatierten Tyrosinreste an Aminosäureposition 1664 bis 1680 erforderlich (Leyte et al, 1991). Um das Faktor-VIII-Protein zu aktivieren, schneiden niedrige Konzentrationen von Thrombin bzw. Faktor Xa an 3 Arg-Ser-Peptid-Bindungen (Arg³⁷², Arg⁷⁴⁰ und Arg¹⁶⁸⁶) (Pittman et al, 1993; Eaton et al, 1986). Die Inaktivierung des Faktor-VIII-Proteins erfolgt an Aminosäureposition 336 und 562 durch aktiviertes Protein C (Kaufmann, 1992a).

1.4 Das Faktor-VIII-Protein

Das aktive Protein besteht aus insgesamt 5 Abschnitten, gegliedert in eine leichte und eine schwere Kette, und bindet an die Oberfläche von Phospholipidmembranen der Thrombozyten (Abb. 8).

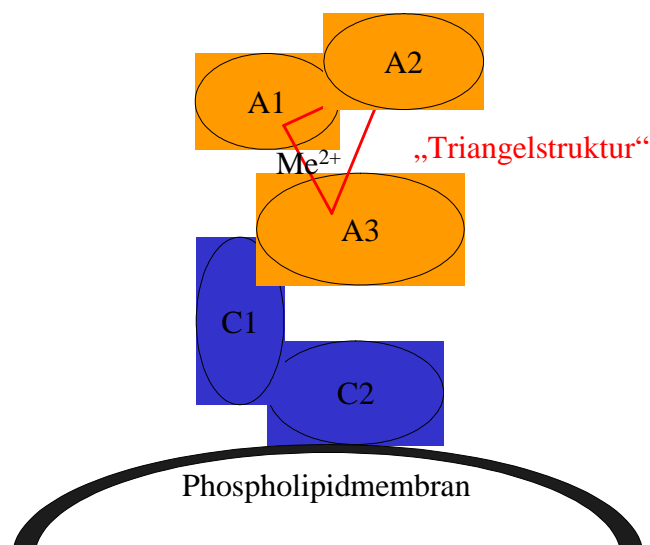


Abb. 8: Tertiäre Struktur des aktiven FVIII Protein. Besonders an der Faltung ist die sogenannte Triangelstruktur, die über Metallionen gehalten wird.

Die A-Domäne

Die A-Domäne besteht aus 3 Bereichen (A1, A2 und A3), die eine 40 %ige Homologie untereinander, zum Faktor V und zum Ceruloplasmin, einem kupferbindenden Protein, aufweisen (Abb. 9) (Toole et al., 1984; Vehar et al., 1984). Die Kristallstruktur von Ceruloplasmin wurde als Grundlage verwendet, um ein Model für die A-Domänen zu schaffen (Stoilova et al., 2002; Pemberton et al, 1997; Thompson et al, 1997). Die A-Domänen sind wie das Ceruloplasmin in der Lage, Metallionen zu binden (Tagliavacca et al., 1997).

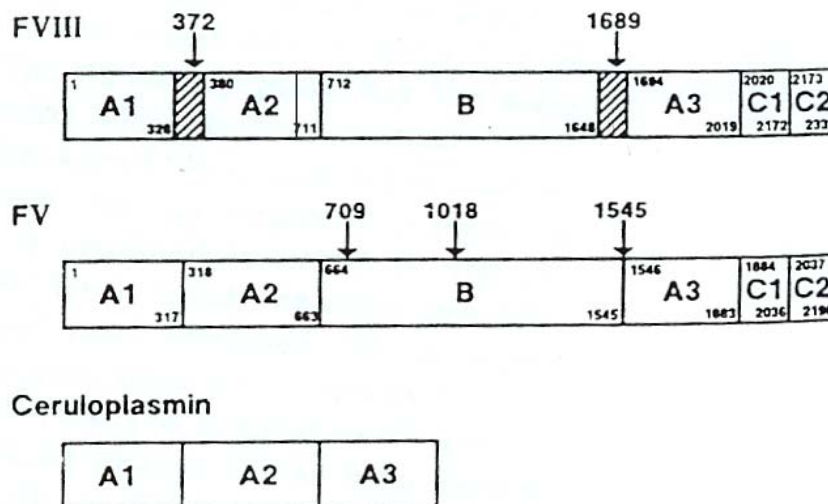


Abb. 9: Proteinvergleich zwischen FVIII, FV und Ceruloplasmin. Bei diesen 3 Proteinen liegt eine große Homologie zwischen den 3 A-Domänen vor.

In diesem Modell sind die 3 Abschnitte in einer Triangelstruktur angeordnet (Abb. 8), wobei A1 und A2 auf der schweren Kette und A3 auf der leichten Kette lokalisiert sind. Die Untereinheiten der schweren und leichten Kette werden durch eine Metallionenbindung zwischen A1 und A3 verknüpft. Die einzelnen Abschnitte sind durch kurze saure Regionen getrennt (a1, a2, a3), die eine Anhäufung von Asparagin- und Glutaminsäure vorweisen (Oldenburg et al, 2000). In der A2-Domäne sind 2 Schleifen identifiziert worden. Die eine bildet ein Epitop für Allo- oder Autoantikörper und besteht aus den Aminosäuren 484 bis 508 (Healey et al, 1995). Die zweite Schleife bildet das katalytische Zentrum bei der Interaktion mit Faktor IXa. Sie wird aus den Aminosäuren 558 bis 565 gebildet (Fay et al, 1994; O'Brien et al, 1995; Bajaj et al, 2001). Eine zweite Bindungsstelle für Faktor IXa befindet sich nahe dem Ende von A3 an Aminosäureposition 1810 bis 1818 (Lenting et al, 1996). Der aktive Faktor VIII ist sehr instabil, da einzelne Untereinheiten, insbesondere die A2-Domäne, der Dissoziation unterliegen (Hoyer et al, 1994). Die Inaktivierung von Faktor VIII erfolgt durch aktiviertes Protein C (APC), welches an die A1- und an die A3- Domäne (an Aminosäureposition 336 und 562) bindet (Kaufmann, 1992a; Lapan et al, 1997 und 1998; Walter et al, 1990).

Die B-Domäne

Die B-Domäne wird durch ein einziges Exon (Exon 14, Aminosäureposition 741 bis 1648) kodiert und weist keine Homologien zu anderen Proteinen auf. Auch zur B-Domäne von Faktor V bestehen nur 14% Homologie, wogegen die A- und die C-Domänen hochkonserviert sind. Ceruloplasmin besitzt keine B-Domäne (Abb. 9). Die B-Domäne beinhaltet 19 von 25 Glykosylierungsstellen an Asparagin-Seitenketten. Da das Fehlen des Bereiches der Aminosäuren Thr⁷⁶⁰ - Asn¹⁶³⁹ keinen Einfluss auf die katalytischen Fähigkeiten des Faktor VIII Proteins hat, ist eine direkte Beteiligung der Domäne am Gerinnungsgeschehen unwahrscheinlich (Burke et al, 1986; Pittman et al, 1993). Tatsächlich ist die Funktion dieser Domäne noch unbekannt. Man nimmt an, dass sie durch sterische Gegebenheiten (Carboxyl-Gruppen) das Faktor-VIII-Protein vor Thrombin – Aktivität schützt, da B-Domänen-deletierter-Faktor-VIII wesentlich sensibler auf Thrombin reagiert (Eaton et al, 1987). Der B-Domänen-deletierte-Faktor-VIII wird 5 bis 10fach höher exprimiert und besser sekretiert (Dorner

et al, 1987). Eine weitere Aufgabe der B-Domäne ist wahrscheinlich die Regelung der FVIII-Synthese und des FVIII-Prozessings.

C-Domäne

Die C-Domäne besteht aus 2 Regionen, der C1- (AS 2020 bis 2172) und C2-Domäne (AS 2173 bis 2332) und bildet das Carboxylende des Faktor-VIII-Proteins. Beide Regionen haben eine 40%ige Homologie untereinander (Wood et al, 1984; Vehar et al, 1984) und zu den C-Domänen des Faktor V (Jenny et al., 1987). Außerdem besteht eine 20%ige Homologie in der Aminosäuresequenz zu den ersten 150 Aminosäuren (Bindung von Galactoseoxidase) zu Dictyostelium – Lektinen ((Wood et al., 1984)). 1999 wurde die Kristallstruktur der C2-Domäne ermittelt (Pratt et al, 1999). Sie zeigt, dass die C2-Domäne eine β -Sandwich – Struktur bildet und die C1-Domäne „Kopf an Kopf“ kovalent an C2 gebunden ist. Am Carboxylende von C2 befindet sich die Bindungsstelle des Faktor-VIII-Proteins zu den Phospholipiden (Foster et al, 1990). Ebenfalls lokalisiert auf der C2-Domäne sind 2 Bindungsstellen für den vWF, eine am Aminoende (Lollar et al, 1988; Precup et al, 1991), die andere am Carboxylende (Wise et al, 1993). Bei isolierter C2-Region wurden Bindungsstellen für Thrombin sowie für Faktor Xa identifiziert (Nogami et al, 1999 und 2000). Für die C1-Region wird vermutet, dass sie die Bindung von vWF zu der C2-Region verbessert.

1.5 Mutationen

Im Faktor VIII sind viele Arten von Mutationen nachgewiesen worden, wobei sich dieses bei der Vielfalt und der Größe des Gens oft als sehr schwierig erweist. Es wurden folgende Mutationstypen gefunden: Punktmutationen (Missense-, Nonsense- und mRNA – Splice – Site – Mutationen), große und kleine Deletionen/Insertionen und Inversionen (Oldenburg et al, 2003).

Mutationsprofil bei Patienten mit schwerer Hämophilie A

<i>Mutationstyp</i>	<i>Prävalenz in %</i>
Intron-22-Inversionen	49.2
Intron-1-Inversionen	1.2
Stop-Mutationen	12.8
Missense-Mutationen	12.7
Kleine Deletionen/Insertionen	14.1
Große Deletionen/Insertionen	4.0
Spleißstellen-Mutationen	3.5
Keine Mutationen in der FVIII-cDNA	1.5

Die detaillierte Auflistung der einzelnen Mutationen ist in der HAMSTeRs-Datenbank („Haemophilie A Mutation, Structur, Test, Resource Site“) unter <http://www.europium.csc.mrc.ac.uk> zu finden.

Punktmutationen

Punktmutationen machen ~ 30% des Mutationsspektrum aus. Darunter fallen:

Missense Mutationen

Der Einfluss von Missense-Mutationen auf die Funktion des Faktor-VIII-Proteins ist abhängig von der Funktionsänderung der Aminosäure an sich und vom Ort im Protein an dem dieser Austausch stattfindet (z. B. aktive Zentren oder Bindungsstellen). Ist der Charakter der Aminosäure ähnlich der ursprünglichen (z. B. hydrophob, gleiche Ladung) kann es sein, dass der Schweregrad der Hämophilie eher leicht oder mild ist. Auffällig ist, dass Missense – Mutationen im inneren Bereich der B-Domäne sehr selten sind. Das kann daran liegen, dass hier Mutationen keinen Einfluss auf die Faktor-VIII-Aktivität haben.

Nonsense- bzw. Stop- Mutationen

Da in diesem Fall, abhängig von der Position, an der der Abbruch stattfindet, große Teile des Proteins fehlen, ist es in den meisten Fällen völlig inaktiv. Patienten mit dieser Art von Mutation sind von einer schweren Form der Hämophilie A betroffen. Durch Nonsense Mutationen wird der Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) vermittelt, d.h., dass die Ausbildung der Stopcodons (TAA, TAG, TGA) den schnellen Abbau des Transkriptes induziert (Mendell et al., 2004).

mRNA – Splice – Site – Mutationen

Splice – Site – Mutationen werden bei allen Schweregraden der Hämophilie A, abhängig davon, ob noch ein funktionstüchtiges Protein exprimiert wird, diagnostiziert. Bei dieser Punktmutation ist das sogenannte „Exonskipping“ möglich, d.h., dass ein Exon übersprungen werden kann (Tavassoli et al, 1998).

Hotspots an CpG-Dinukleotide

Im FVIII-Gen existieren Regionen, an denen es zu einer höheren Mutationsrate kommt („Hotspots“). Hierzu zählen neben der Intron-22-Inversion, Punktmutationen an CpG-Dinukleotiden. 30% der Punktmutationen finden an CpGs statt (Cooper et al., 1988; Higuchi et al., 1991); man spricht von einer Hypermutableität. Es finden an diesen Positionen Transitionen von C → T durch eine Desaminierung von 5'-Methyl-Cytosin statt (Duncan et al, 1980). Verantwortlich hierfür ist die häufige Methylierung an dieser Position (Cooper et al., 1990). Im Faktor-VIII-Gen existieren 72 dieser CpGs; entsprechend 2 % des gesamten Gens. Die CpG-haltigen Codons kodieren vor allem für Arginin (CGA, CGC, CGG und CGT).

Deletionen / Insertionen

Diese Form der Mutation hat ein großes Wirkungsspektrum, d.h., jede Ausprägung der Hämophilie A fällt darunter. Deletions- / Insertions- Mutationen beinhalten über eine Leserasterverschiebungen den Verlust / Addition von Aminosäuren bis hin zu dem Verlust / Addition von Teilen des Proteins (Tuddenham et al, 1994; Ginelli et al, 1976; Antonarakis et al, 1995). Kleine Deletionen / Insertionen sind wesentlich häufiger als große. Insbesondere an längeren Folgen von Adeninnukleotiden kommt es vermehrt durch einen Fehler der Polymerase zu kleinen Deletionen / Insertionen.

Inversionen

Im Faktor VIII Gen sind besonders 2 Inversionen aufgetreten, die Intron-1-Inversion und die Intron-22-Inversion. 50% der Patienten mit einer schweren Hämophilie A werden durch die Intron-22-Inversion hervorgerufen. Diese Mutation beruht auf einer intragenen Rekombination des Faktor VIII Gens zwischen einem 9 kb langen homologen Bereich des Intron 22 (Int22h-1, intragen) und 2 damit identischen Kopien am Telomerende (Int22h-2, proximal und Int22h-3, distal) während der Meiose (Lakich et al, 1993; Naylor et al, 1993). Die Inversion der distalen Kopie kommt häufiger vor, da deren Abstand zum Int22h-1 größer ist als der Abstand von Int22h-1 zu Int22h-3.

Bei ~ 2% der Patienten sind keine kausalen Mutationen im kodierenden Bereich und ihren flankierenden Regionen diagnostiziert worden (Uen et al., 2003). Verantwortlich für solche Fälle könnten Defekte in den Kooperationspartnern und in mit dem FVIII in Wechselwirkung tretende Proteine, wie z. B. der vWF (Schneppenheim et al, 1996) sein. Eine andere Möglichkeit könnte eine Störung des intrazellulären „Processings“ sein, d.h., dass der Transport des Proteins vom ER über den Golgi-Apparat aus der Zelle nicht funktioniert (Graw et al, 2003).

1.6 Expression von rekombinanten Faktor VIII

Da es keine natürliche Zell-Linie gibt, die Faktor-VIII exprimiert (Marquette et al, 1995), ist es nicht möglich die Biosynthese von Faktor-VIII in natürlicher Umgebung zu untersuchen. Eine Ausnahme machen hier die Endothelzellen der adrenalen Medulla (Markschicht der Nebenniere) des Rindes. Hier wurde Faktor-VIII-Aktivität im Medium und im Zellysatz nachgewiesen, allerdings wurde kein Faktor-VIII-Antigen-Nachweis erbracht (Banerjee et al, 1992). Experimente mit Säugerzellen, die mit Faktor VIII Expressionsvektoren transfiziert worden sind, haben gezeigt, dass die Zellen in der Lage sind, das Faktor VIII Protein zu exprimieren und es ins Medium zu sezernieren (Kaufman et al, 1988). Die verschiedenen Expressionsstudien haben gezeigt, dass

- die Proteine synthetisiert und sezerniert werden
- die Faltung und Anordnung der Disulfidbrücken dem des Wildtyp entsprechen
- die Serin/Threonin- und die Asparagin- gebundenen Glykosylierungen an der richtigen Position sind
- andere posttranslationale Modifikationen korrekt sind (Kaufman, 1992b).

Für experimentelle Studien kommt eine Reihe von immortalisierten Säugerzellen in Frage. Allerdings sprechen folgende wichtige Gründe für den Einsatz von Chinesische Hamster Ovar Zellen (CHO):

- Sie bauen das fremde Gen in ihr eigenes Genom ein, d.h., sie sind stabil.
- Viele Proteine sind schon erfolgreich in hohen Konzentrationen in CHO-Zellen exprimiert worden.
- CHO-Zellen wachsen auch in Abwesenheit von Serum.
- CHO-Zellen besitzen die Fähigkeit adhärent oder in Suspension zu wachsen.
- Verschiedene Proteine sind zugelassen, die in CHO-Zellen exprimiert wurden.
- Sie können im großen Maße fermentiert werden.

Trotz dieser geeigneten Zell-Linie ist es bis heute sehr schwierig, aktives Faktor-VIII-Protein in geeigneten Mengen zu exprimieren. Vergleiche mit Proteinen gleicher Größe haben gezeigt, dass Faktor VIII (trotz Verwendung des gleichen

Expressionsvektors) 2-3fach weniger exprimiert wird (Kaufman et al, 1985 und 1986). Bei Versuchen mit Affennierenzellen (COS) war die Expression vom Faktor-VIII-Protein sogar um das 10fache geringer als die Expression des nahe verwandten Faktor V. Da allerdings das mRNA-Niveau des Faktor VIII nicht etwa 10fach, sondern nur 2fach geringer war als das des Faktor V, und beide mRNAs gleich stark translatiert wurden, mußte die Ursache für den Expressionsunterschied in der Sekretion von Faktor VIII liegen. Gleiche Ergebnisse erzielte man mit Versuchen in CHO-Zellen (Pittman et al, 1994). Werden COS-Zellen allerdings mit dem B-Domänen-deletierten Expressionsvektor transfiziert, so lag das mRNA-Niveau 17fach höher als das des kompletten Faktor-VIII. Der Einfluss der B-Domäne auf die Sekretion des Faktor-VIII ist schon früh untersucht worden. 1986 zeigte Burke durch getrennte Expression der schweren und leichten Kette, dass die schwere Kette leichter sekretiert wird als die leichte. Ein Jahr später gelang es Dorner experimentell zu zeigen, dass eine Deletion der B-Domäne zu einem Protein führt, dessen geringere Bindung zum BiP in einer höheren Sekretion resultiert. Er nahm an, dass die B-Domäne mit dem BiP interagiert. Erst 1995 entdeckte Marquette in Expressionsversuchen mit chimären Faktor-VIII-Proteinen, dass eine Region von 110 Aminosäuren in der A1-Domäne für diese Bindung verantwortlich ist. Eine Rolle bei der Sekretion spielt ein weiteres Protein, das Calnexin. Es interagiert mit der B-Domäne des Faktor-VIII-Proteins (Kaufman et al, 1997). Die B-Domäne hat also keinen direkten Einfluß auf die Aktivität des Proteins in der Gerinnung, sondern es ist anzunehmen, dass sie u. a. eine Rolle bei der Sekretion aus dem ER spielt. Da verschiedene Proteine mit unterschiedlich großen Deletionen in der B-Domäne exprimiert wurden (Eaton et al, 1986; Sarver et al, 1987; Meulien et al, 1988; Langner et al, 1988; Bihoreau et al, 1991; Mertens et al, 1993; Pittmann et al, 1993; Donath et al, 1995; Haack et al, 1999) und es in allen Fällen zu einer schnelleren Aktivierbarkeit dieser Proteine durch Thrombin kam, lag die Schlussfolgerung nah, dass die B-Domäne eine Schutzfunktion im vollständigen Protein ausübt (Mosesson et al., 1990). Pittman zeigte 1993 und 1994 u. a., dass die Expression der B-Domänen-deletierten Proteine im Vergleich zum Wildtyp in CHO-Zellen 10-20fach höher ist.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Am Anfang der Arbeit sollte in Bonn ein System zur Expression rekombinanter mutierter Faktor VIII Proteine etabliert werden. Zu diesem Zweck erfolgte ein Aufenthalt in Leuven am „Centre for Molecular and Vascular Biology“ von 6 Monaten, um die Methoden, die dort erfolgreich zur Anwendung kamen, zu erlernen. Im Anschluss sollten die Methoden in Bonn etabliert werden. Der Aufenthalt wurde von der „Gesellschaft für Thrombose und Hämostase Forschung“ (GTH) im Rahmen eines Stipendiums gefördert.

Anhand der HAMSTeRs – Datenbank und aus eigenen vorhandenen Daten wurden 9 Punktmutationen in der B-Domäne für die Expressionsversuche ausgewählt.

Bei Val993Leu, Glu1038Lys, Asn1441Lys, Leu1462Pro, Glu1579Asp und Ala1591Ser handelte es sich um natürlich vorkommende Missense-Mutationen, die bei den betroffenen Patienten unter Verdacht stehen, eine Hämophilie A mit mittleren bis schweren Verlauf hervorzurufen. Alle Mutationen lagen inmitten der B-Domäne, abseits der Thrombinschnittstellen. Bei der Missense-Mutation Pro928Arg handelte es sich um einen Polymorphismus, da der betroffene Patient ebenfalls eine Inversion 22 vorwies, die wahrscheinlich für die schwere Hämophilie verantwortlich war. Die Mutation Asp1241Glu stellte einen der 2 häufigen Polymorphismen in der B-Domäne dar. Die Missense-Mutation an der Aminosäureposition Arg1310Gly war die einzig nicht natürlich vorkommende FVIII-Variante und wurde als Beispiel für eine Mutation an einem CpG-Dinukleotid gewählt.

- 1) Zum *Ersten* sollte ein einfaches, sowie effektives Expressionssystem für den rekombinanten Faktor-VIII entwickelt werden, welches es uns ermöglicht, das Protein in ausreichender Menge zu exprimieren und funktionell zu charakterisieren. Mit der Technik, Missense-Mutationen in das Wildtyp-FVIII-Protein einzuführen und diese mutierten Proteine zu exprimieren, besteht die Möglichkeit funktionelle Bereiche in der B-Domäne zu entschlüsseln. Bei einer erfolgreichen Etablierung kann dieses Systems zur Charakterisierung bei anderen Gerinnungsfaktoren eingesetzt werden.

- 2) Zum *Zweiten* wollten wir die Kausalität von Mutationen und Polymorphismen, von denen einige die einzige gefundene Veränderung in dem FVIII-Gen von Patienten waren, untersuchen. War der Genotyp wirklich verantwortlich für den Phänotyp der Krankheit? Hier war das Ziel die rekombinante Herstellung und funktionelle Charakterisierung dieser Proteinvarianten. Mit diesen Untersuchungen sollten weitere Erkenntnisse über die Bedeutung der B-Domäne für die Proteinaktivität und für die Sekretion des FVIII-Moleküls gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendetes Material

Alle verwendeten Chemikalien, Biochemikalien, Nährmedien und Enzyme wurden von folgenden Firmen in Analysequalität bezogen.

2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind kommerziell von folgenden Firmen erhältlich: Merck, Roth, Serva und Sigma

Applied Biosystems (Perkin-Elmer Corporation), Weiterstadt: ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit

Behring, DADE, Marburg: Faktor VIII Chromogen

Immuno, Heidelberg: Immunochem FVIII:C Reagent Kit, Immunozytm FVIII:Ag Kit

Stratagene, Heidelberg: Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis Kit

Merck, Darmstadt: H₂O, Eisessig

Peq Lab: Agarose peq Gold universal, dNTPs

Nunc, Wiesbaden: Nunclon Delta Zellkulturschalen in verschiedenen Größen, Kryoröhrchen

Quiagen, Hilden: QIAgen Plasmid Kits (Mini und Maxi) QIAquick PCR Purification Kit

Serva, Heidelberg: 0,1% Bromphenolblau

Biometra: Kammern für die Electroporation, Gene Pulser™

Eurogentic, Amsterdam: DNA Längenstandard (Smart Ladder)

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf: Reaktionsgefäße, Tischzentrifuge

Millipore, Schwalbach: Sterilfilter

2.1.2 Lösungen, Puffer, Nährmedien, Gele

Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA: LB-Medium, Bacto Yeast Extract, Bacto Tryptone, Agar

Gibco BRL, Eggenstein: Dulbecco's Nut F 12 Medium, Trypsin-EDTA, Glutamin (flüssig), OPTIMEM, PBS, Fötale Kälber Serum (FBS), Geneticin, Gentamicin

2.1.3 Vektoren

Der Expressionsvektor pcDNA3FVIII Wildtyp wurde uns freundlicherweise von Dr. Torsten Tonn (Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Das Wildtyp-FVIII-Protein wurde über die die *Xho* I-Schnittstelle der „multiple cloning site“ (mcs) in den käuflichen Vektor pcDNA 3 von Invitrogen eingefügt.

2.1.4 Oligonukleotide

In den folgenden Tabellen (Tab. 2 und 3) sind die Oligonukleotide, die in der PCR und in der Sequenzierung verwendet worden sind, aufgelistet.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	AS-Pos.	Anmerkung
BM928 - S	AAAAAGTCATCTCG <u>CT</u> TAAGTCTGGTGGACCTCTG	928	MPr CCC(Pro) → CGC (Arg), Sense
BM928 - AS	AGACTCAGTAAGGCGAGATGACTTTTTGCCAAATAGAGT	928	MPr CCC(Pro) → CGC (Arg), Anti-Sense
BM993 - S	GCCTTATTCAA <u>CT</u> TAGCATCTCTTTGTTAAAGACAAAC	993	MPr GTT(Val) → CTT (Leu), Sense
BM993 - AS	CAAAGAGATGCTAAGTTTGAATAAGGCATTATCTTTAGT	993	MPr GTT(Val) → CTT (Leu), Anti-Sense
BM1038 - S	GAAAGTGACACTAAGTTTAAAAAAGTGACACCTTTGATT	1038	MPr GAG(Glu) → AAG (Lys), Sense
BM1038 - AS	CACTTTTTTAA <u>CT</u> TAGTGTCACTTTCTAATATATTTTG	1038	MPr GAG(Glu) → AAG (Lys), Anti-Sense
BM1441 - S	GGAGOCAAAAAA <u>AA</u> ACCTTTCTTTAGCATTCTAACC	1441	MPr AAT(Asn) → AAA (Lys), Sense
BM1441 - AS	TAAAGAAAGGTTT <u>TT</u> TTTTTTGGCTCCTTGTAAGAAATG	1441	MPr AAT(Asn) → AAA (Lys), Anti-Sense
BM1579 - S	ATAOCAAAAGAAGATTGGAAATOC AAGAGAAGTCAOCA	1579	MPr GAG (Glu) → GAT (Asp), Sense
BM1579 - AS	TTGGGATTTCAATCTTCTTTGGTATCTGAGTACCATA	1579	MPr GAG (Glu) → GAT (Asp), Anti-Sense
BM1591 - S	CCAGAAAAACATCTTTTAAGAAAAAGGATAACATTTTG	1591	MPr GCT (Ala) → TCT (Ser), Sense
BM1591 - AS	CTTTTTCTTAAAGATGTTTTTCTGGTGACTTCTCTTG	1591	MPr GCT (Ala) → TCT (Ser), Anti-Sense
BM1462 - S	GAGGTTGGCTCC <u>CG</u> GGGACAAGTGCCACAAATTCAGTC	1462	MPr CTG(Leu) → CCG (Pro), Sense
BM1462 - AS	GGCACTTGTCOC <u>CG</u> GGGAGOCACCTCTCTTTGATCAC	1462	MPr CTG(Leu) → CCG (Pro), Anti-Sense
BM1310 - S	AATTTTGTCACGCAAGGTAGTAAGAGAGCT	1310	MPr CGT(Arg) → GGT (Gly), Sense
BM1310 - AS	AGCTCTCTTACTAC <u>CT</u> TGCGTGACAAAATT	1310	MPr CGT(Arg) → GGT (Gly), Anti-Sense
P1241 - S	AATGTAGAAGGTTCATATGAGGGGGCATAT	1241	MPr GAC(Asp) → GAG (Glu), Sense
P1241 - AS	ATATGCCCCCTCATATGAACCTTCTACATT	1241	MPr GAC(Asp) → GAG (Glu), Anti-Sense

Tab. 2: Mutationsprimer. Auflistung der für die Mutagenese verwendeten Primer. Die im Vergleich zum Wildtyp veränderte Base ist unterstrichen

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Anmerkung
M928-Seq-S	CAACAGAGTTGAAGAACTT	Sequenzprimer für Mutation 928 und 993, Sense
M928-Seq-AS	TTTAAATAACCTACCACTCT	Sequenzprimer für Mutation 928 und 993, Anti-Sense
M1038-Seq-AS	TAAAGAAGGACATATCTGGA	Sequenzprimer für Mutation 1038, Anti-Sense
M1441-Seq-S	AAAGGTATCATCATTTCCAA	Sequenzprimer für Mutation 1441 und 1462, Sense
M1441-Seq-AS	GTCCTTCTGATAAATGTGAA	Sequenzprimer für Mutation 1441 und 1462, Anti-Sense
M1579-Seq-S	TGGAATGAAGCAAACAGACC	Sequenzprimer für Mutation 1579 und 1591, Sense
M1579-Seq-AS	GAGAGCACAGCCTTTTCAGTC	Sequenzprimer für Mutation 1579 und 1591, Anti-Sense
P1241-Seq-S	CAGAAACCTATTTCTTACTA	Sequenzprimer für Mutation 1241 und 1310, Sense
P1241-Seq-AS	GGTTTGATTTCCCAAGCCTT	Sequenzprimer für Mutation 1241 und 1310, Anti-Sense

Tab. 3: Sequenzierprimer. Die Lage der Sequenzierprimer wurde ungefähr 100 Basen vor der mutierten Base gewählt.

2.1.5 *E. coli*-Stämme

Escherichia coli Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind Derivate von *E. coli* K12.

XL 10 Gold Ultracompetent cells waren im Mutagenese Kit von Stratagene enthalten. Subcloning Efficiency DH5 α Competent cells wurden von Life Technologies bezogen.

2.1.6 Zellen

Die Hamster Ovar Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Herrn PD Dr. R. Schwaab überlassen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Plasmid – DNA - Präparation

Plasmid-DNA aus 3 – 5 ml Übernachtskultur wurde mit Hilfe eines Plasmid-Reinigungs-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Eluierung der Plasmid-DNA erfolgte in 32 μ l Aqua dest.

Plasmid-DNA aus 150 ml Übernachtskultur wurde mit Hilfe des Maxi-Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt. Hier erfolgte die Eluierung des an die Silikatmatrix gebundenen Plasmides in 50 μ l Aqua dest. Nach DNA-Konzentrationsbestimmung wurde mit Aqua dest. bis zu einer Endkonzentration von 1 μ g/ μ l aufgefüllt. Plasmide zur Lagerung wurden in hochkonzentriertem Salzpuffer eluiert; Plasmide zur sofortigen Weiterverwendung in Aqua dest pH 7.

2.2.2 Mutagenese

Die Mutagenese des Vektors pcDNA3FVIII erfolgte mit dem QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Das Ausgangsplasmid (pcDNA3FVIII) mußte vorher aus Zellen isoliert werden, welche die Fähigkeit hatten, das Plasmid zu methylieren, um später den maternalen Strang durch den Verdau mit dem Enzym *Dpn* I zu entfernen.

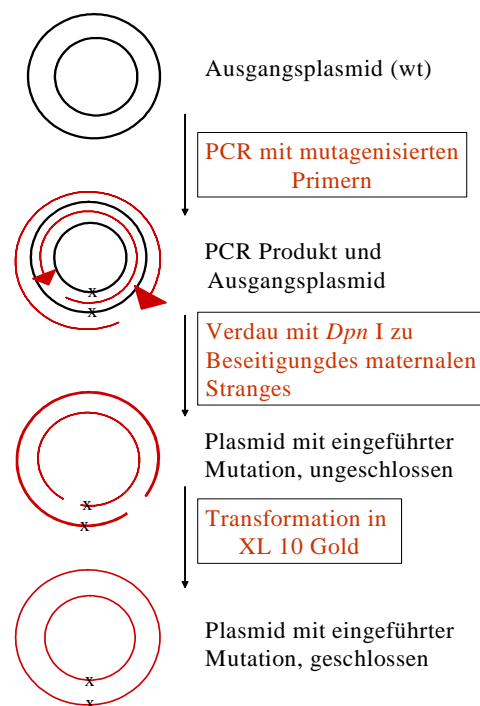


Abb. 10: Mutageneseprinzip. Ausgehend von einem Expressionsvektor wurde über mutagenisierte Primer eine Mutation eingeführt. Da der maternale Strang im Gegensatz zum PCR Produkt methyliert war, konnte er ohne Probleme mit *Dpn* I verdaut werden.

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Der Ansatz der PCR erfolgte nach Herstellerangaben:

x µl	(10 ng) dsDNA Template pcDNA3FVIII
5 µl	10x Reaktionspuffer
x µl	Oligonukleotid 1 (125 ng)
x µl	Oligonukleotid 2 (125 ng)
1 µl	dNTP Gemisch
3 µl	QuickSolution
ad 50 µl	Aqua dest
1 µl	<i>Pfu Turbo</i> DNA Polymerase

Der Ansatz wurde gemischt und abzentrifugiert.

Das PCR-Gerät wurde nach dem folgenden Reaktionsprotokoll programmiert:

94°C 1 min		Anfangsdenaturierung
94°C 50 sek		Denaturierung
60°C 50 sek	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">16 Zyklen</div>	Oligonukleotidanlagerung
68°C 25 min		Polymerisation
68°C 7 min		Verlängerung der Polymerisation
4°C Ende		Kühlung der Proben

Die optimale Temperatur für die Oligonukleotidanlagerung hängt von deren Struktur ab. Sie lässt sich durch folgende Berechnung der theoretischen Schmelztemperatur (T_m) annäherungsweise ermitteln:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ GC}) - 675/N - \% \text{ Punktmutationen}$$

- N steht für die Primerlänge in Basen
- Prozentgehalt GC und Punktmutationen müssen in ganze Zahlen angegeben werden

2.2.2.2 Enzymatische Spaltung des maternalen Stranges

Vor dem Verdau werden 10 µl des PCR-Produktes auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, um zu kontrollieren, ob die Amplifikation stattgefunden hat. Um den methylierten maternalen Strang herauszuschneiden, wurden die restlichen 40 µl des PCR-Produktes mit 1 µl *Dpn* I (10 U/µl) versetzt, abzentrifugiert und 1 Std. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Da das PCR-Produkt, welches die Mutation enthielt, nicht methyliert war, wurde es bei dem Restriktionsverdau nicht angegriffen.

2.2.2.3 Transformation

Zur Vervielfältigung der mutierten Plasmid-DNA erfolgte eine Transformation in Bakterienzellen. Dazu wurden ultrakompetente XL10-Gold Zellen verwendet, die in dem Kit beinhaltet waren. Zu 45 µl Zellsuspension wurden 2 µl β-Mercaptoethanol-Mix hinzugefügt. Der Mix wurde vorsichtig vermischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert, wobei alle 2 Minuten gemischt wurde. Danach wurden 5 µl des Restriktionsverdaus den Zellen hinzugefügt und alles vorsichtig vermischt. Es folgte eine Inkubation der kompetenten Zellen mit der DNA für 30 Minuten auf Eis, 30 Sekunden Hitzeschock bei 42°C, Inkubation des Ansatzes für 2 Minuten auf Eis, Zugabe von 500 µl LB-Medium, Inkubation bei 37°C für eine Stunde unter kräftigem Schütteln. Anschließend wurden Aliquots von je 250 µl der Transformationsansätze auf Selektivagarplatten (Ampicillin) ausplattiert. Bakterien, die kein Plasmid besitzen, können aufgrund der fehlenden Ampicillin-Resistenz nicht wachsen. Zur Kontrolle der am nächsten Tag erhaltenen Transformanten wurden für jede Mutation 3 Übernachtskulturen in je 3 ml LB/Amp –Medium angeimpft und unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert und auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Größe des Plasmids mit der des Ausgangsplasmids vergleichen zu können.

2.2.3 Umklonierung in Dh5α-Zellen

Da die Ausbeute der Plasmide aus den XL10-Gold-Zellen sehr gering war, erfolgte eine Umklonierung von je 2 Plasmiden in der richtigen Größe in Dh5α-Zellen. Hierfür

gab man 3 µl des aus XL10-Gold isolierten Plasmides zu 50 µl Dh5α-Zellsuspension und inkubierte 30 Minuten auf Eis. Es folgte eine Hitzeschock-Reaktion bei 37°C im Wasserbad und anschließende Inkubation für 2 Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 250 µl LB-Medium wurde unter kräftigem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde. Danach folgte die Ausplattierung von je 100 µl auf Selektivagarplatten und Inkubation über Nacht bei 37°C. Am folgenden Tag wurden je 2 Klone pro Platte gepickt und in je 3 ml Selektionsmedium (Ampicillin) angeimpft und erneut über Nacht unter Schütteln oder Rotieren bei 37°C inkubiert.

2.2.4 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 1%igen bzw. 2%igen Agarosegelen (Sambrook et al., 1989) in TAE (Tris/Acetat/EDTA)-Puffer (40 mM Tris/Acetate pH 8,0; 1 mM EDTA). Als Größenstandard wurde ein Marker der Firma Eurogentec (Smart-Ladder) verwendet. Die Gele wurden in Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml in Wasser) gefärbt und nach kurzem Wässern im UV-Durchlicht bei 302 nm fotografiert.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA-Konzentration

Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration und deren Reinheit wurde photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt. Ein Verhältnis von 1.8 - 2 zeigt die Abwesenheit von Proteinen an. Ein ΔE_{260} -Wert von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook et al., 1989).

2.2.6 Sequenzierung

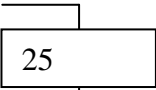
Die automatische Sequenzierung der vermutlich positiven Klone erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) mit einem Fluoreszenz - Sequenzierautomaten (Abi-Prism 310 – Genetic –Analyser). Einsträngige DNA wurde mit Hilfe eines Oligonukleotides, einer DNA-Polymerase und den vier

Desoxynukleotiden vervielfältigt. Im Ansatz befanden sich zusätzlich unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide im Unterschluß, die bei Einbau die Polymerisationsreaktion stoppten, da aufgrund der fehlenden OH-Gruppe keine Verlängerung mehr möglich war. Es kam zum Kettenabbruch. So entstand ein Gemisch aus DNA-Fragmenten verschiedener Länge, die alle ein markiertes ddNTP am 5'-Ende trugen. Durch Hitzedenaturierung wurden die neu entstandenen Fragmente von der DNA-Matrix getrennt und über ein Polyacrylamidgel electrophoretisch getrennt. Die Detektion erfolgte, da beim Durchlauf der Proben bei einer bestimmten Gelebene diese durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt wurden und das emittierte Fluoreszenzlicht in digitaler Form gespeichert wurde. Ausgangsprodukt für die Sequenzierreaktion war ein aufgereinigtes Plasmid (s. 2.1.3), dessen Konzentration über ein Agarosegel und mit Hilfe eines Spektrophotometers bestimmt worden war. Es folgte die PCR für die Sequenzierung.

Reaktionsansatz für die Sequenzierung:

150 ng	aufgereinigtes Plasmid (in H ₂ O gelöst)
4 µl	Sequenz – Reaktionspuffer
32 pmol	Oligonucleotid
3 µl	„Big Dye“ (Reaktionsmischung)
ad 20 µl	H ₂ O

Nach Vortexen des Reaktionsgemisches wurde es im Thermocycler folgenden Bedingungen ausgesetzt:

96°C	10 Sek.		Denaturierung
45°C	10 Sek.		Annealing
60°C	4 Min.		Extension
4°C			Abkühlung der Proben

Um die nicht eingebauten Terminatoren aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde das Reaktionsprodukt mit dem „Dye – Ex – 2.0 Spin – Kit“ (Qiagen)

aufgereinigt. Da einsträngige DNA nicht stabil ist, wurden vor dem Erhitzen (2 min, 90°C) dem gereinigten Produkt 5 µl TSR (Template-Supressor-Reagenz) zugegeben. Um eventuelle Luftblasen zu eliminieren, wurde der Ansatz abzentrifugiert und bis zum Laden im Kapillar – Sequenzer auf Eis gelagert. Es folgte die automatische Sequenzanalyse durch den Abi Prism 310. Die erhaltenen Daten wurden mittels des Programms Analysis analysiert. Der Vergleich mit der Wildtypsequenz erfolgte manuell sowie mit dem Programm CEQ.

2.2.7 Lagerung von *E. coli* Stock-Kulturen

Nach Bestätigung des Vorhandenseins der Mutation durch die Sequenzierung, wurden von den rekombinanten Klonen Stock-Kulturen angefertigt. Hierfür wurden zu 830 µl einer in exponentiellem Wachstum befindlichen Kultur 170 µl 87%iges Glycerin pipettiert. Die Suspension wurde gut gemischt und bei –80°C gelagert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultur

Es wurde ausschließlich mit einer Zelllinie gearbeitet. Hierbei handelte es sich um Chinesische Hamster – Ovarzellen (CHO), welche in Nut-F12-Medium mit 1% Gentamicin wuchsen. Die Zellen wurden im Inkubator bei 5% CO₂-Zufuhr und 37°C gehalten. Um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen, wurde ein Gefäß mit sterilem Wasser auf den Boden des Inkubators gestellt. Sämtliche Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank statt. Da die Zellen sich im ständigen Wachstum befanden, mußten sie, sobald der gesamte Boden der Kulturschale bedeckt war, gesplittet werden. Dazu wurde die Kulturschale, nach Waschen mit PBS, mit Trypsin-EDTA bei 37°C 3 – 5 min inkubiert. Die Menge des verwendeten PBS bzw. des Trypsins war abhängig von der Größe der Kulturschale. Durch sanftes Klopfen der Schale auf dem Tisch lösten sich die Zellen vom Boden des Gefäßes. Das „Abdauen“ der Zellen wurde durch Zugabe von FKShaltigem

Medium gestoppt. Bei 100%iger Konfluenz wurden die Zellen 1:10 bzw. 1:20 gesplittet, abhängig von der weiter benötigten Zell-Zahl.

2.3.2 Transfektion von CHO-Zellen

Die Überführung fremden Genmaterials in eine eukaryotische Wirtszelle ist eine Methode, die es erlaubt, die Wirtszelle zu Leistungen zu bringen, die vorher nicht im Repertoire der Zelle lagen bzw. die diese in bisher nicht gewünschten Maße erbrachte.

Die Transfektion der CHO-Zellen erfolgte über die Elektroporation (Neuman et al, 1982), bei der in kurzer Zeit eine große Zellzahl transfiziert werden kann. Die Zellsuspension wurde in Gegenwart einer fremden DNA-Lösung einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt. So wurden in der Zellmembran Poren für einen kurzen Zeitraum erzeugt, durch welche die DNA in die Zelle gelangen konnte (Sukharev, 1994). Die Bildung der Poren ist von verschiedenen Faktoren abhängig, z.B. von der Art des verwendeten Mediums bei der Elektroporation. Da die Zellmembran eine Isolierung des elektrisch leitfähigen Cytoplasmas darstellt, kann elektrischer Strom so lange nicht fließen, bis Poren in der Membran entstanden sind. Dies geschieht bei 0,4 – 1 V, weil hier die transmembranale Spannung ihren kritischen Wert erreicht und eine lokale Zerstörung der Membranintegrität spontan zur drastischen Erhöhung ihrer Leitfähigkeit führt. Die primär entstandenen hydrophoben Poren verwandeln sich bei Erreichen eines kritischen Radius spontan in relativ stabile hydrophile Poren (0,5 – 1 nm) mit einer Lebensdauer zwischen wenigen Sekunden bis einigen Minuten (Sukharev, 1994). Die DNA gelangt nun durch Diffusion oder unter Beteiligung von Elektrophorese in die Zelle (Klenchin, 1991). Zur Wiederherstellung der Membranintegrität müssen die Poren wieder geschlossen werden, wobei neben dem Absenken der Temperatur vor allem die Zusammensetzung des Elektroporationsmediums entscheidend ist.

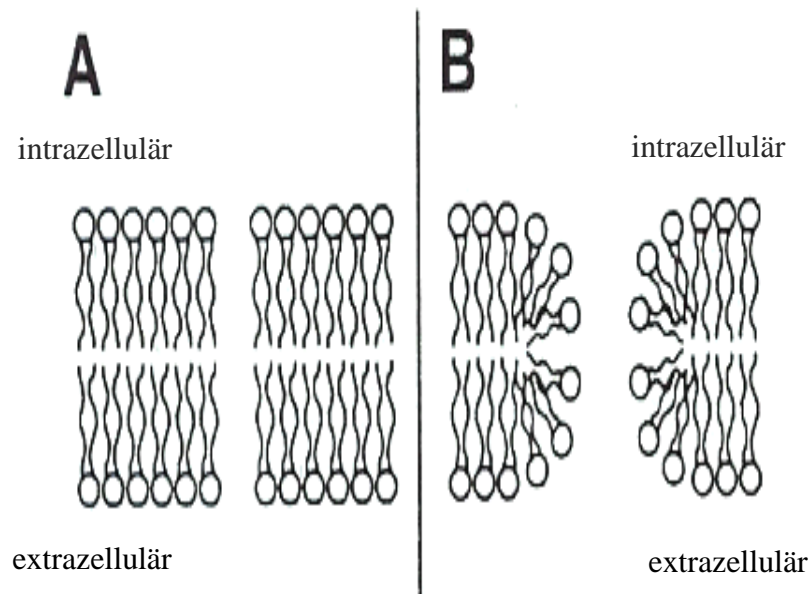


Abb. 11: Schematische Abbildung der Porenbildung bei Lipidmembranen in einem elektrischen Feld. A) Kurzlebige hydrophobe Pore, B) „stabile“ hydrophile Pore (Sukharev et al, 1994)

Durchführung:

Nach Bestimmung der Lebendzellzahl durch die Zählkammer wurde eine Zellsuspension von 10^6 Zellen/ml hergestellt. Die Zelle befanden sich im Transfektionsmedium, welches kein FKS enthielt. Dieses hätte die Transfektionseffizienz stark verkleinert. In der Küvette wurden zu 800 μl Zellsuspension 20 – 25 μl (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Plasmid hinzugefügt.

Die Transfektion erfolgte bei:

800 μF	elektrische Kapazität
200 V	Stromstärke
800 – 850 μl	Gesamtvolumen

Die Elektroporationskammer war stets ausgelastet, d.h., alle 4 Plätze mußten laut Angabe des Herstellers besetzt sein, gegebenenfalls mit einer Leerprobe, welche nur mit Medium gefüllt war.

Nach dem Versetzen der Probe mit dem elektrischen Strom, wurde diese vorsichtig aus dem Gerät entfernt und, zum Schließen der Poren, auf Eis gelagert. Die transformierte Zellsuspension wurde mit einer Pipette in eine runde Kulturschale überführt, die 10 ml Normalmedium (Nut F12 + FKS) enthielt. Die Küvette wurde nochmals mit Medium nachgespült, um alle Zellen in die Kulturschale zu überführen. Es folgte eine Ruhepause für die Zellen von 48 Stunden. Danach wurde mit der Selektion begonnen.

2.3.3 Mikroskopische Kontrolle

Um das Wohlbefinden der Zellkulturen zu sichern, mußten sie regelmäßig mikroskopisch kontrolliert werden. Besonders wichtig war die Kontrolle in der Selektionsphase, da das Antibiotikum zytostatisch wirkte, d.h. die Zellen nicht abtötete, sondern im Teilungskreislauf hemmte, die Zellen sich also nicht mehr vermehren konnten. Die Kontrollen erfolgten mit einem Umkehrmikroskop (Zeiss).

2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Für die Wachstumsgeschwindigkeit war die anfängliche Zellzahl (Inokulum) bei adhärent wachsenden Zellen sehr wichtig, weil zu dünn ausgesäte Zellen nur sehr langsam wachsen würden und zu dicht ausgesäte Zellen oft subkultiviert werden müßten, welches die Gesamtlebensdauer der Zelllinie verkürzen würde. Ebenfalls benötigte man die Lebendzellzahl für die Transfektion, weil hier für ideale Bedingungen eine Zellzahl von 1×10^6 ideal war, sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch den Trypanblau – Ausschluß – Test mittels eines Häemocytometers (Neubauer – Zählkammer).

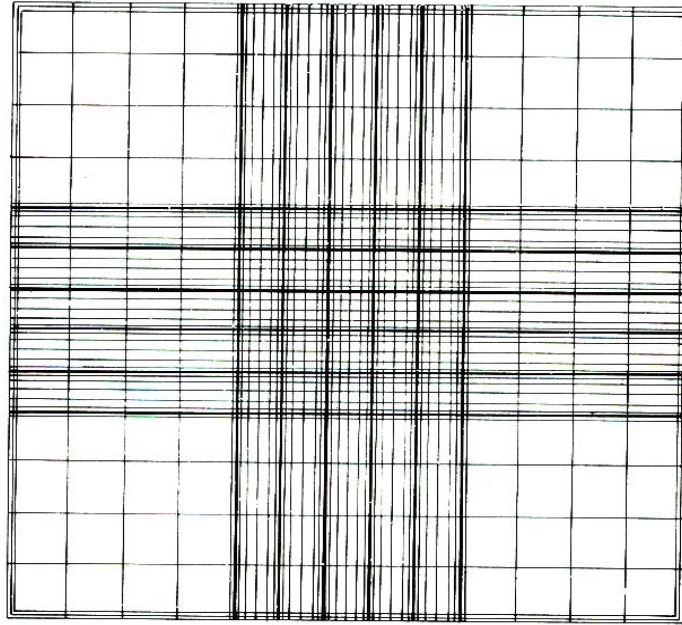


Abb. 12: Abbildung einer Neubauer Zählkammer. Die Auszählung erfolgt in der Überlappung der Schraffierungen.

Nach Reinigung der Kammer mit Alkohol wurde das Deckglas angefeuchtet und mit etwas Druck auf die Kammer gepreßt bis die sogenannten „Newtonringe“ erschienen. Diese zeigten, dass die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt war (0,1 mm). Nach einer 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau (10 µl Zellsuspension + 90 µl Trypanblau-EDTA) wurden 10 µl dieser Lösung vorsichtig mit Hilfe einer Pipette unter das Deckglas gegeben. Während vitale Zellen in der Lage waren, den Farbstoff auszuschließen und im mikroskopischen Bild hell erschienen, nahmen tote Zellen das Trypanblau auf und waren tiefblau gefärbt. Die Zählkammer bestand aus 9 großen Quadraten. Jedes Quadrat hatte eine Fläche von 1 mm², woraus eine Tiefe von 0,1 mm und ein Volumen von 0,1 µl resultierten. Es wurden 4 große Quadrate ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Berechnung der eigentlichen Zellzahl erfolgte aus dem Mittelwert $\times 10^4$ (Kammerfaktor) $\times 10$ (Verdünnungsfaktor Trypanblau). Daraus ergab sich die Zellzahl pro ml.

2.3.5 Selektion

Das hier verwendete Selektionssystem war die Neomycin/Geneticinresistenz, die durch die vom *neo* – Resistenzgen des bakteriellen Transposons TnS kodierte Aminoglycosid – Phosphotransferase APH(3') vermittelt wurde (Colbore-Garapin et al., 1981). Ohne *neo*-Resistenzgen band das Amino – Glycosid – Antibiotikum Geneticin an die 80S – Ribosomen und hemmte so die Translation; es wirkte also nicht zytotoxisch, sondern zytostatisch. Dadurch variierte der nötige Zeitraum, um die Zellen abzutöten, die kein Plasmid aufgenommen hatten; er war ebenfalls abhängig von der Aussaatdichte, dem proliferativen Status und der Größe des Kulturgefäßes. In der Regel schwankte er zwischen 14 – 20 Tagen. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt, so wurden die abgestorbenen Zellen entfernt und die Zufuhr von frischem Medium und G418 gesichert, um die optimalen Bedingungen zu gewährleisten. Außerdem wurden die Ansätze alle 2 Tage mikroskopisch kontrolliert, um eine Zellteilung der positiven Klone zu überwachen.

2.3.6 Herstellung eines stabilen Klons

Die Voraussetzung für eine stabile Expression war die Integration der transfizierten DNA in das Wirtsgenom. Dieses war durch die Selektion von 2 – 3 Wochen gewährleistet, so dass ein einzelner Klon isoliert werden konnte:

Nachdem das alte Medium abgesaugt und die Kultur 2 x mit PBS gewaschen wurde, folgte das Lösen der Zellkultur vom Boden der Zellkulturschale mit 2 – 3 ml Trypsin – EDTA. Das Abdauen der Zellen wurde mit 5 ml Selektionsmedium gestoppt und die Zellzahl bestimmt. In einer Reihenverdünnung wurden die Zellen bis zum Erreichen einer Zellzahl von 60 Zellen/ml verdünnt. 1 ml dieser Suspension versetzte man mit 19 ml Selektionsmedium, so dass in einem Gesamtvolumen von 20 ml nur noch 60 Zellen vorhanden waren. Dieses wurde auf eine 96 – well – plate (~200 µl/well) gleichmäßig verteilt, so dass die Verteilung ≤ 1 Zelle/well betrug. Parallel wurde, falls die Vereinzellung nicht funktioniert, 1 ml des Ansatzes 10^3 Zellen/ml ebenfalls mit 19 ml Selektionsmedium verdünnt und auf eine 96 – well – plate verteilt. Die Ansätze wurden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Inkubator inkubiert. In den darauffolgenden

4 – 5 Wochen erfolgte eine genaue mikroskopische Kontrolle der Ansätze. Alle 1 – 2 Tage wurde überprüft, wie viele Zellen sich in einer Vertiefung befanden und ob es zu einer optimalen Teilungsrate kam. Der Mediumwechsel erfolgt alle 2 – 3 Tage. Nach 5 – 6 Wochen waren die Zellen zu 90 – 100 % konfluent, und es wurden von ausgewählten Klonen (ausgehend von einer Zelle) ein Teil des Mediums abgenommen und im Aktivitätstest eingesetzt. Nach Feststellung der positiven Klone (FVIII-Aktivität im Test) wurden ~2 Klone ausgewählt, welche im Anschluß hochgezogen wurden.

2.3.7 Hochzucht

Da für die Überproduktion des FVIII – Proteins eine hohe Zellzahl benötigt wurde, wurden die Zellen bis auf eine Kulturschalengröße von 25 ml Medium hochgezogen.

Nach Bestimmung der positiven Klone wurde das Medium aus der 96 – well – Platte abgesaugt und 50 µl Trypsin – EDTA in die betreffende Vertiefung gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von ~5 min bei 37°C wurden die 50 µl in denen sich die abgelösten Zellen befanden, abgenommen und in eine 24 – well – Platte überführt. Jedes well wurde vorher mit 1 ml Selektionsmedium befüllt. Es folgte die Inkubation der Platte bei 37°C, bis die Zellen konfluent waren. In der Regel war dieser Zustand nach 5 – 7 Tagen erreicht. Es wurde erneut auf die nächst größere Kulturschalengröße übertragen, indem das alte Medium abgesaugt und 200 µl Trypsin-EDTA zugegeben wurde und, nach 5 min. Inkubation, bei 37°C die gesamten 200 µl Zellsuspension in 3 ml Selektionsmedium in eine 6 – well – Platte überführt wurden. Nach 5 – 7 Tagen Inkubation waren die Zellen konfluent. Es wurde so lange nach diesem Schema verfahren bis die Kulturschale eine Volumengröße von 25 ml erreichte (über 5 ml und 15 ml Zwischenstufen). Waren die Zellen bei diesem Volumen konfluent, konnte mit der Induktion begonnen werden.

2.3.8 Induktion von CHO – Zellen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Optimierung der Expression transfizierter Gene. Die Steigerung der Genexpression durch Natriumbutyrat basiert auf der Begünstigung einer aktiven Chromatinform. Zusätzlich, zu einer Erhöhung der transienten Expression, kann es auch zur vermehrten Bildung stabil transfizierter Zellen führen (Koch – Brandt et al., 1993). Die Endkonzentration an Natriumbutyrat im Medium betrug 3 mM. Hierfür wurden von einem 300 mM Stock 5 ml auf ein Mediumvolumen von 500 ml hinzugefügt.

2.3.9 Lyse von CHO - Zellen

Für die Lysierung der CHO Zellen wurde ein Zell-Lyse-Puffer angefertigt.

150 mM	NaCl
1%	Nonidet P40
50 mM	Tris HCl

Der Puffer wurde auf einen pH Wert von 8 eingestellt.

Die abzentrifugierten Zellen wurden in 1 ml des NP40 Puffers resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte das Abzentrifugieren der Zellfragmente und der Überstand konnte direkt in die folgenden Aktivitätstest bzw. Antigen-ELISA eingesetzt werden.

2.3.10 Herstellung und Lagerung von CHO – Stock – Kulturen

Sobald die Überproduktion beendet war, wurden von den Zellen Stock – Kulturen angefertigt, um bei Bedarf auf diese zurückgreifen zu können.

Die Lagerung von Zellen bei -80°C kann für kurze Zeit durchgeführt werden, für einen längeren Zeitraum ist aber die Lagerung bei -196°C in flüssigem Stickstoff notwendig. Diese Art der Lagerung bewahrt die Zellen unter anderem vor Kontamination und vor Variabilität durch Subkultivierung. Als Schutzsubstanz diente

Dimethylsulfoxid (DMSO). Sie verhindert die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle, sowie die partielle Dehydratation des Cytoplasmas.

Die Zellen wurden trypsiniert und in 5 ml Normalmedium aufgenommen. Nach 5 min. Zentrifugation bei 500 g wurden die Zellen in 2 ml Medium resuspendiert (Zellsuspension). In Kryoröhrchen wurden 100 µl DMSO gegeben und 1 ml der Zellsuspension hinzugefügt. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in einen runden Behälter gestellt, der in der Außenwand 96%igen Alkohol enthielt. Dieses garantierte ein schonenderes Einfrieren bei -80°C . Nach Lagerung der Zellen für 12 – 48 Stunden bei -80°C wurden die Zellen, falls sie nicht in den nächsten 3 Wochen benötigt wurden, in spezielle Gestelle in der Flüssigphase des Stickstoffs gelagert.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der FVIII – Aktivität

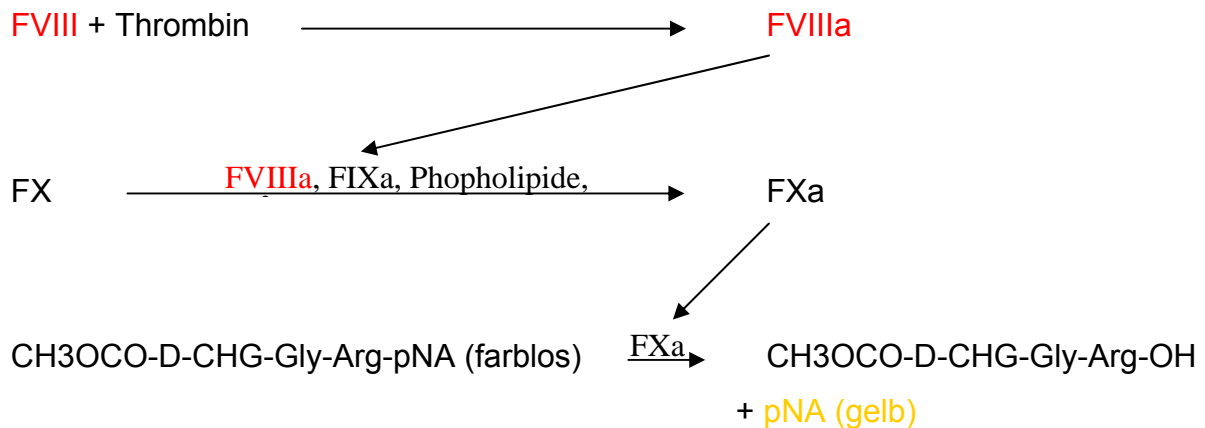
Es wurde auf 2 verschiedenen Wegen die Aktivität der verschiedenen FVIII-Proteinvarianten bestimmt. Beide Methoden basieren auf der Aktivierung eines chromogenen Substrates, wobei eine Bestimmung maschinell am „MLA Electra 900C“ und die andere manuell am Photometer durchgeführt wurde. In beiden Testsystemen wurde das mit rFVIII angereicherte Zellkulturmedium wie eine Plasmaprobe behandelt und eingesetzt.

2.4.1.1 Electra – maschinell

Bei diesem Test wurde das kommerziell verfügbare Bestimmungssystem „Dade[®] Faktor VIII Chromogen“ der Firma Behring verwendet. In diesem chromogenen Test wurde der rFVIII in der Probe erst durch Thrombin aktiviert. Der so aktivierte FVIII (FVIIIa) beschleunigt dann die Umwandlung des Faktor X zu Faktor Xa. Für diese Reaktion war die Anwesenheit von aktivierten Faktor IX (FIXa), Phospholipiden und Calciumionen notwendig. Die FXa – Aktivität wurde durch Hydrolyse eines FXa – spezifischen p-Nitroanilid – Substrates gemessen. Bei diesem FVIII – Aktivitätstest

handelte es sich um einen indirekten Nachweis, d.h., es wurde die Ausgangsmenge des freigesetzten p-Nitroanilin (pNA), gemessen bei 405 nm, bestimmt, die proportional zur FXa – Aktivität war, somit ebenfalls zur FVIII – Aktivität der Probe.

Reaktionsschema:



Der gesamte Reaktionsablauf wurde maschinell vom MLA Electra 900C durchgeführt.

Die Mediumproben wurden bis zur Bestimmung der FVIII-Aktivität, direkt nach Abnahme von der Zellkultur, auf Eis gelagert. Zur Bestimmung wurden die Proben 1:41 mit NaCl 0,9%ig verdünnt. Die Analyse der Aktivitätswerte erfolgte durch die Maschine, welche die Ergebnisse über eine gespeicherte Eichkurve bestimmte. Zur Kontrolle der Eichkurve wurden 2 Kontrollplasmen (P + N) vor jeder Bestimmung eingesetzt.

2.4.1.2 Immuno – manuell

Die Bestimmung der FVIII – Aktivität erfolgte mit dem Kit „Immnochrom FVIII : C“ von Hyland Immuno Diagnostics. Das Testprinzip beruhte auf dem gleichen Reaktionsablauf wie bei dem Test von Behring, die Proben und die Referenzen wurden allerdings von Hand pipettiert. Um Abweichungen zu kontrollieren, wurden

Doppelbestimmungen durchgeführt. Um Abweichungen durch zeitliche Verzögerungen beim Pipettieren zu überprüfen, wurden die Ansätze einer Eichkurve am Anfang und am Ende pipettiert. Nachdem die Reagenzien (A, B und das Substrat-Puffer-Gemisch) in den vorgegebenen Mengen an Aqua dest. gelöst waren, wurden sie 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie im Test eingesetzt werden konnten. Die Medienproben wurden 1:41 mit FVIII – Verdünnungspuffer (Imidazol, NaCl, Albumin, pH 7,4; im Kit enthalten) verdünnt (50 µl Probe + 2 ml Puffer). Die gesamte Bestimmung erfolgte nach der Endpunktmethode bei Raumtemperatur.

Testdurchführung

Reagenz A (Phospholipide, Albumin)	100 µl
Reagenz B (FIV, FX, Ca ²⁺ , Thrombin, Albumin)	100 µl
Plasma 1:41	100 µl
Inkubation	5 min
Substrat-Puffer-Gemisch (Imidazol, NaCl, Albumin, Tris, EDTA)	500 µl
Inkubation	3 min
Essigsäure 20% nm	Messung E ₄₀₅

Die 1. Messung wurde sofort nach Abstoppen der Probe mit 20%iger Essigsäure in einer Küvette (mit einer Schichtdicke von 1 cm) im Photometer bei 405 nm durchgeführt. Nach 30 min. Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Messung wiederholt, um evtl. Abweichungen durch verzögerte Reaktionen zu kontrollieren. Aus den Werten des Referent Standards, dessen Kalibrierung gegen einen

internationalen Standard erfolgte, wurde eine Bezugskurve erstellt. Aus dieser konnten die gemessenen FVIII – Aktivitäten direkt abgelesen werden. Um genauere Werte zu erhalten, wurde die Geradengleichung der Bezugskurve erstellt (Excel 5.0) und die FVIII – Aktivitäten rechnerisch bestimmt.

2.4.2 Bestimmung der FVIII – Antigen – Konzentration mittels ELISA

Die Bestimmung der FVIII – Antigen – Konzentration (FVIII:Ag) erfolgte über einen Enzym – Immuno – Assay (Immunozytm FVIII:Ag) von Hyland Immuno Diagnostics. Bei diesem Test wurde die FVIII:Ag – Konzentration unabhängig von seiner Aktivität mittels monoklonaler Antikörper bestimmt. Die eingesetzten Antikörper waren gegen Epitope auf der intakten leichten Kette des FVIII – Moleküls gerichtet. Der Test basierte auf dem Prinzip eines 2 – Schritt – ELISAs.

Testprinzip:

Bei dem 1. Antikörper, welcher an die Oberfläche der Vertiefung des ELISA-Teststreifens gekoppelt war, handelte es sich um einen monoklonalen Anti – FVIII – Antikörper. Es wurden nun die Proben mit dem FVIII in den Vertiefungen inkubiert, so dass FVIII:Ag an die immobilisierten Antikörper gebunden wurde. Unspezifische Probenbestandteile aus dem Medium wurden durch einen Waschschrift entfernt. Es folgte eine Konjugatreaktion, bei der das gebundenen FVIII:Ag mit einem Anti – FVIII:Ag – Antikörper - Peroxidase – Konjugat überschichtet wurde. Ungebundenes Konjugat wurde in einem weiteren Waschschrift entfernt. Bei der 3. Reaktion (Substratreaktion) oxidierte die Peroxidase des Konjugates mit H_2O_2 das Chromogen zu einer blau gefärbten Substanz. Die Zugabe von Schwefelsäure stoppte diese Reaktion und bewirkte einen Farbumschlag nach gelb (Abb. 13). Die Intensität der gelben Farbe war direkt proportional zur FVIII:Ag – Konzentration. Sie wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt und über eine Bezugskurve quantitativ bestimmt.

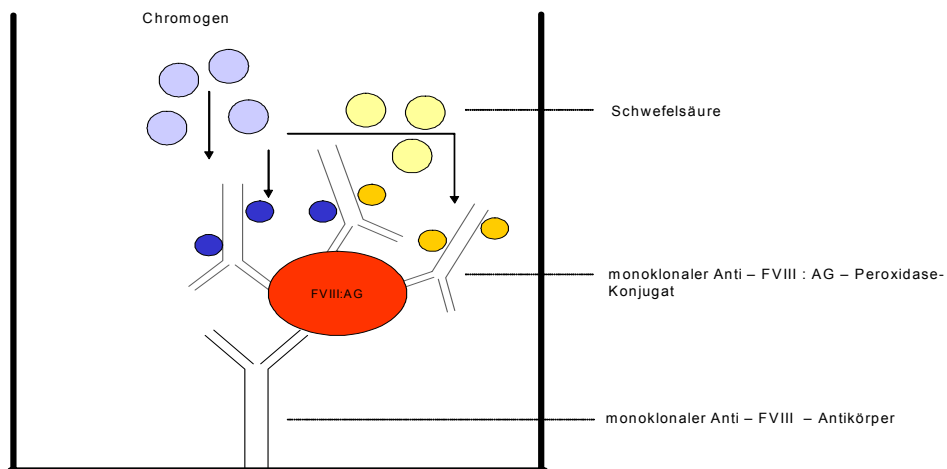


Abb. 13: Antigen-ELISA. Indirekter Nachweis von FVIII:Ag. Die monoklonalen FVIII-Antikörper lagen schon gekoppelt an dem Reaktionsgefäß vor.

Vor Testbeginn wurden alle benötigten Komponenten nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Für die FVIII – Proben wurde eine geringe Konzentration angenommen und somit nur 1:5 mit FVIII:Ag – Inkubationspuffer (im Kit enthalten) verdünnt und 10s gevortext. Die gleiche Vorgehensweise erfolgte bei den Referenzen und den Kontrollplasmen.

Testablauf:

Probeninkubation	Pipettieren der verdünnte Referenzen, Kontrollplasmen und Proben in die Testvertiefungen, Teststreifen mit Folie abdecken.	200 µl
	Inkubation bei Raumtemperatur	120 min
Waschen	Waschpuffer H	3 x 200 µl
Konjugatreaktion	Pipettieren der Konjugatgebrauchs- lösung in die Testvertiefung, Teststreifen mit Folie abdecken.	200 µl
	Inkubation bei Raumtemperatur	60 min
Waschen	Waschpuffer H	3 x 200 µl
Substratreaktion	Substratlösung in Testvertiefungen pipettieren, Testvertiefungen mit frischer Folie abdecken.	200 µl
	Inkubation bei Raumtemperatur	30 min
Stoppen	Stopplösung in Testvertiefungen pipettieren.	50 µl
Messen	ELISA – Reader, 405 nm	10 s schütteln, Messung in- nerhalb von 10 Minuten

Durch die Differenzwellenlängenmessung bei 450 nm und bei 690 nm wurde die Präzision der Messung erhöht, da durch 690 nm eventuelle Störungen im Kunststoff der Platte heraus gefiltert wurden. Um Fehler durch zeitliche Ungenauigkeiten zu kontrollieren, wurden die Referenzen am Anfang und am Ende des Testes pipettiert. Für die einzelnen Proben erfolgte eine Doppelbestimmung. Die Auswertung des Testes erfolgte über eine Bezugskurve, die aus den Werten der Kalibratoren erstellt wurde. Um möglichst genaue Werte zu erhalten, wurde die Geradengleichung der Bezugskurve erstellt (Excel 5.0) und die Werte für FVIII:Ag rechnerisch bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der Technik

Zu Beginn der Arbeit existierte im Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin an der Universität Bonn keine geeignete Infrastruktur zur Herstellung rekombinanter mutierter Proteine. Während eines 6 monatigen Aufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Prof. J.-M. Saint-Remy am Institut „Center for Molecular and Vascular Biology“, University of Leuven, Belgien erwarb ich eingehende Kenntnisse zu den erforderlichen Materialien, Techniken und Geräten. Nach meiner Rückkehr nach Bonn richtete ich ein Zell-Labor mit allem erforderlichen Equipment ein und transferierte das Knowhow zur Herstellung und Expression rekombinanter mutierter Proteine. Nach einigen Modifikationen der Methoden gelang es mir, ein stabiles System zur Expression von FVIII-Proteinen von Wildtyp und mutierter Variante in CHO-Zellen zu etablieren. Abbildung 14 zeigt eine Zusammenfassung der Methoden, die im Folgenden im Detail erklärt sind.

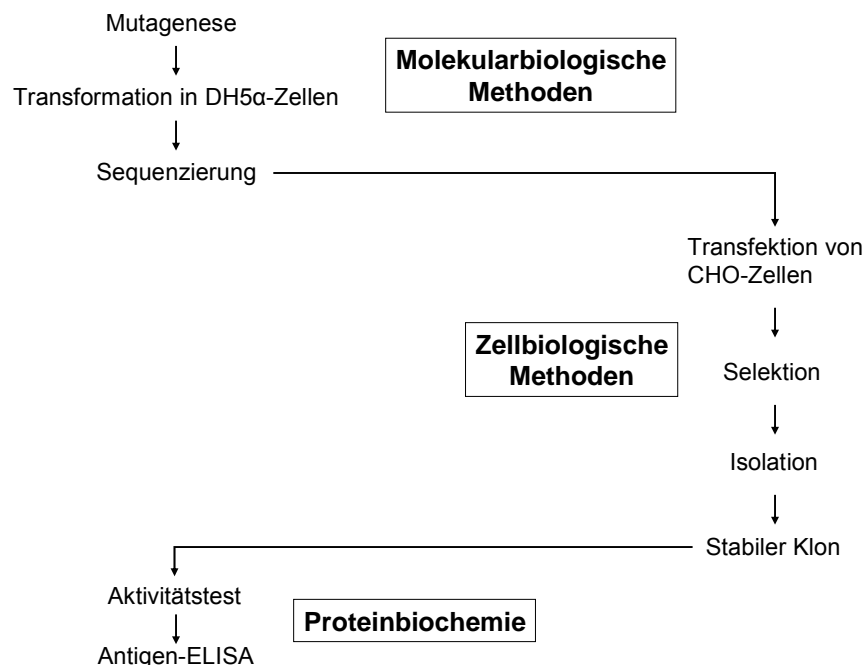


Abb. 14: Darstellung der angewandten und etablierten Methoden als Flussdiagramm.

3.2 Herstellung der unterschiedlichen Expressionsvektoren

In dem Expressionsvektor pcDNA3 wurde im ersten Schritt die FVIII-Wt-cDNA eingebaut und anschließend mittels Mutagenese (s. 2.2.2) die Mutationen eingeführt.

3.2.1 Ausgangsvektor pcDNA3

Ausgehend von dem käuflichen Vektor pcDNA3 (5,4 kb) wurde über die *Xho* I-Schnittstelle an der Nukleotidposition 972 („multiple cloning site“ von pcDNA3) das FVIII-Wt-Gen einkloniert, so dass eine Expressionskassette bestehend aus CMV-Promotor, FVIII-cDNA und BGH pA entstand (Abb. 15).

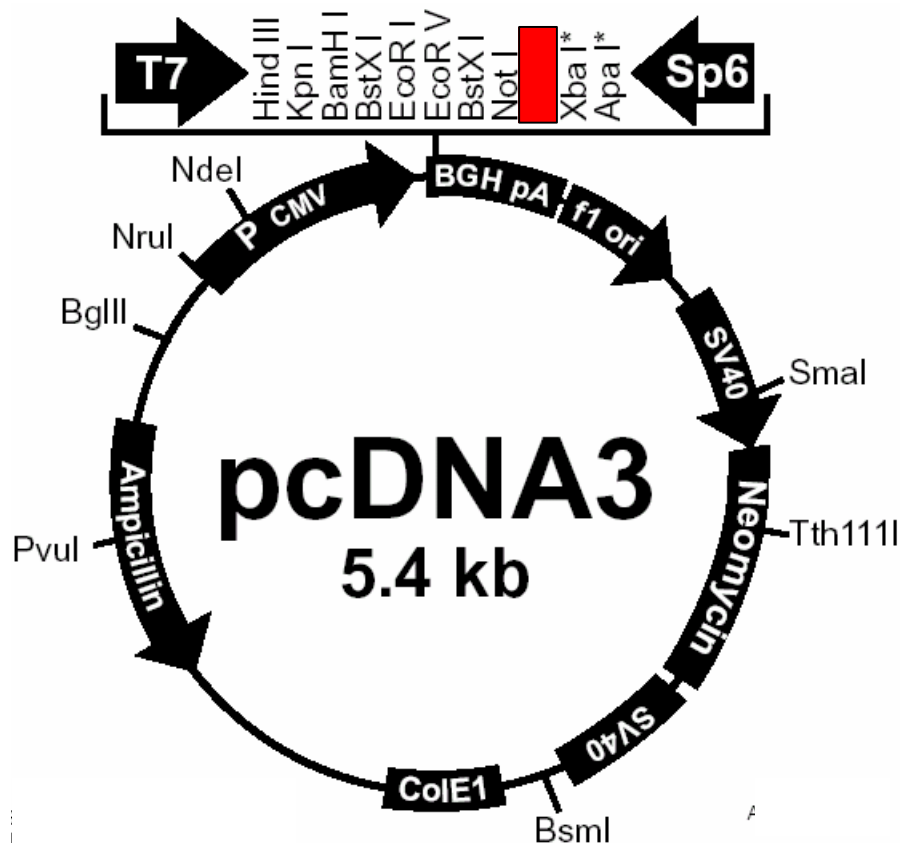


Abb. 15: Ausgangsvektor pcDNA3 von Invitrogen. Über die vorhandene Schnittstelle *Xho* I wurde das Faktor-VIII-Wt Gen kloniert.

Als Selektionsmarker enthielt das Plasmid neben dem Ampicillin-Resistenzgen (Amp^R – ORF, Nukleotidposition 4450 – 5310) auch das Neomycin-Resistenzgen (Neo^R – ORF, Nukleotidposition 2151 – 2932). Vor dem Einklonieren des FVIII-Gens bestand der Vektor aus 5446 Nukleotiden, danach aus 12524 Nukleotiden.

3.2.2 Mutagenese von pcDNA3fVIII

Das Einführen von Mutationen in die FVIII-cDNA erfolgte mittels Mutagenese (Invitrogen Mutagenese-Kit). Hierzu wurde über eine PCR unter Verwendung der *Pfu*-Turbo-Polymerase beide Stränge des Plasmides repliziert (s. 2.2.2). Sowohl der Sense- als auch der Antisense-Primer enthielten den gewünschten Basenaustausch, so dass über die PCR die unterschiedlichen Mutationen eingeführt werden konnten. Die PCR war sehr schwierig, da der Expressionsvektor pcDNA3FVIIIWt eine Größe von 12524 bp hatte. Die Primerlänge betrug in der Regel 30 bp, um die Bindung der Primer, die die Mutation enthielten, an das Template trotz der Fehlpaarung zu gewährleisten. Die *Pfu* Turbo Polymerase war in der Lage, den gesamten Vektor ohne Fehler zu replizieren und benötigte für eine Kopie des maternalen Stranges 25 min. Da die Zyklenzahl nach Vorschrift des Herstellers nicht größer als 16 sein sollte, war das PCR-Produkt sehr schwach, z. T. nicht sichtbar (Abb. 16).

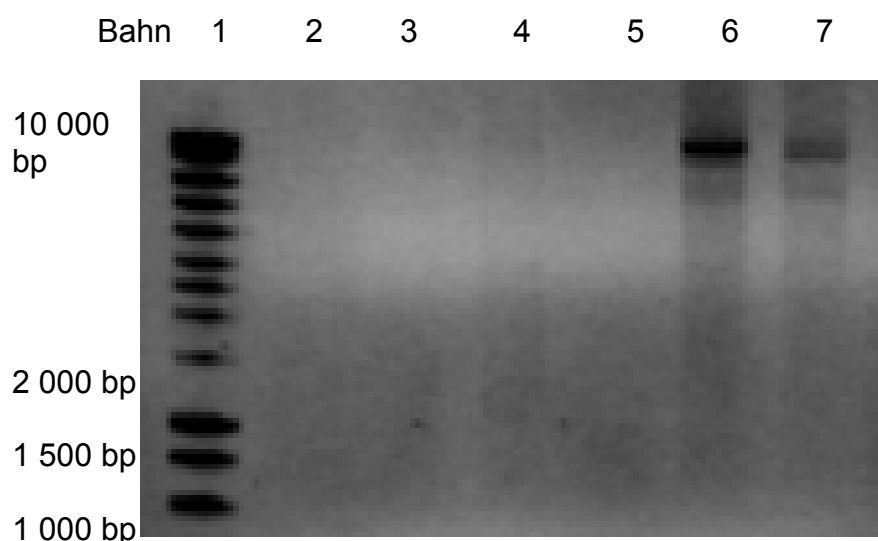


Abb. 16: Beispiel für die PCR vermittelte Amplifikation der mittels Mutagenese hergestellten mutierten Plasmide. Auf Bahn 1 sind 1 μl des

DNA Größenstandards (Eurogentec, Smart Ladder), auf Bahn 2 – 7 10 µl des PCR Produktes nach der Mutagenese-PCR aufgetragen, wobei die Produkte in den Bahnen 2 – 5 sehr schwach waren.

Trotz des nicht sichtbaren PCR-Produktes nach Mutagenese-PCR erfolgte anschließend ein Verdau mit der *Dpn* I Endonuclease, welche spezifisch an methylierter bzw. hemimethylierter DNA und somit nur den maternalen Strang, der als Template diente, verdaute. Nach diesem Verdau wurde die über PCR gewonnene DNA in XL-10 Gold Zellen (Bakterien) transformiert. Diese Zell-Linie wurde für die Transformationen verwendet, da sie in der Lage war, die offenen Stränge zirkulär zu schließen. Nachdem die Zellen gewachsen waren, wurden die Plasmide isoliert und ihre Konzentration auf einem Agarosegel bestimmt. Die Konzentration der Plasmide war allerdings sehr gering und auf dem Gel nicht sichtbar (ohne Abbildung).

Da wir für die weiteren Versuche eine höhere Ausbeute benötigten, wurde eine Maxi-Präparation durchgeführt. Da auch diese nicht den gewünschten Erfolg zeigte, erfolgte eine erneute Transformation des isolierten Plasmides aus XL-10 Gold Zellen in Dh5 α - Subcloning Zellen (ein anderer Bakterienstamm). Nach der Plasmid-Präparation aus dieser Zell-Linie wurden 2 µl auf in Agarosegel aufgetragen (Abb. 17). Auf allen Bahnen zeigten sich jetzt die gewünschten Plasmide in ausreichender Menge.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

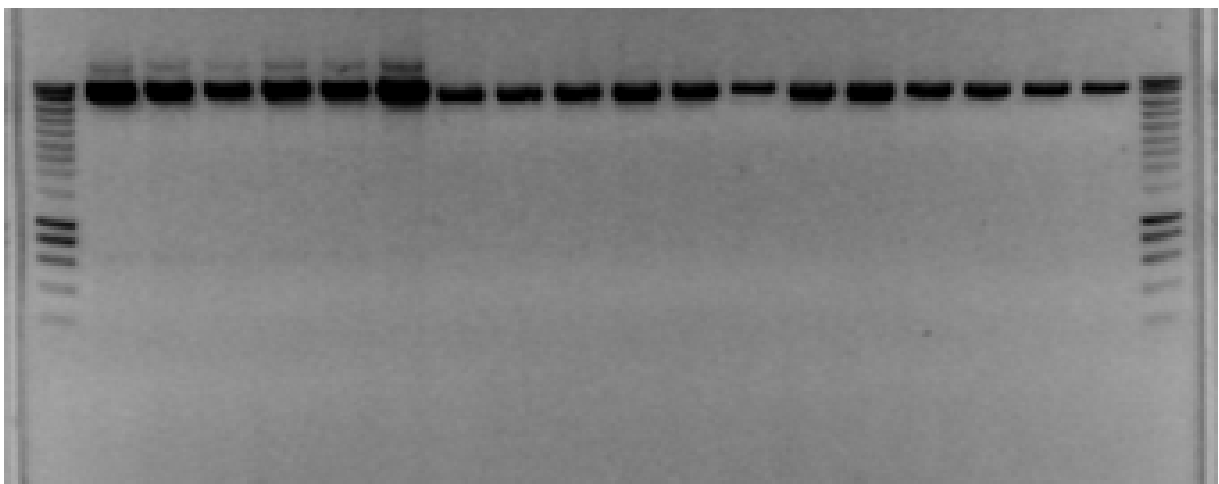


Abb. 17: Plasmide pcDNA3 nach der Isolierung aus DH5 α Zellen. Auf Bahn 1 und 20 wurde der DNA Größenstandard (Eurogentec, Smart Ladder) aufgetragen, auf Bahn 2 und 3 Pro928Arg, auf Bahn 4 und 5 Val993Leu, auf Bahn 6 und 7 Glu1038Lys, auf Bahn 8 und 9 Asp1241Glu, auf Bahn 10 und 11 Arg1310Gly, auf Bahn 12 und 13 Asn1441Lys, auf Bahn 14 und 15 Pro1462Leu, auf Bahn 16 und 17 Glu1579Asp und auf Bahn 18 und 19 Ala1591Asp. Es wurden jeweils 2 μ l des isolierten Plasmides aufgetragen.

3.2.3 Sequenzanalyse

Um sicher zu gehen, dass der gewünschte Aminosäureaustausch mittels der Mutagenese stattgefunden hat, wurde von jedem Plasmid jeweils die Region des Austausches in Leserichtung (5'-3') und gegen die Leserichtung (3'-5') sequenziert. Als Beispiel ist in Abb. 18 ein Teil der FVIII-Sequenzierung (5'-3') gezeigt, die auf Proteinebene zu einem Aminosäureaustausch von Alanin nach Serin an der Aminosäureposition 1591 führt. Über das Programm CEQ erfolgte ein Sequenzvergleich mit FVIII-Wildtyp-DNA.

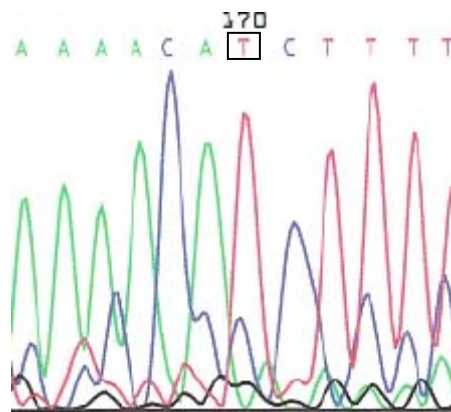


Abb 18: Beispiel einer Sequenz. Teilsequenz der Mutation Ala1591Ser, bei der ein Basenaustausch von G→T erfolgte (AAA ACA GCT TTT → AAA ACA TCT TTT)

Nach diesem Verfahren wurden alle eingeführten Mutationen überprüft. Die nachfolgende Tabelle zeigt schematisch alle durchgeführten Basenaustausche mit der daraus resultierenden Aminosäureveränderung. Ebenfalls aufgeführt sind die Wildtyp-FVIII-cDNA und Wildtyp-FVIII-Proteinsequenz der veränderten Region.

Wildtyp							Mutation 928:						
	Lys	Ser	Ser	Pro	Leu	Thr		Lys	Ser	Ser	Arg	Leu	Thr
wt	AAG	TCA	TCT	CCC	CTT	ACT	928	AAG	TCA	TCT	CGC	CTT	ACT

Wildtyp							Mutation 993:						
	Leu	Phe	Lys	Val	Ser	Ile		Leu	Phe	Lys	Leu	Ser	Ile
wt	TTA	TTC	AAA	GTT	AGC	ATC	993	TTA	TTC	AAA	CTT	AGC	ATC

Wildtyp							Mutation 1038:						
	Ser	Asp	Thr	Glu	Phe	Lys		Ser	Asp	Thr	Lys	Phe	Lys
wt	AGT	GAC	ACT	GAG	TTT	AAA	1038	AGT	GAC	ACT	AAG	TTT	AAA

Wildtyp							Mutation 1241:						
	Arg	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ala		Arg	Ser	Tyr	Glu	Gly	Ala
wt	AGG	TCA	TAT	GAC	GGG	GCA	1241	AGG	TCA	TAT	GAG	GGG	GCA

Wildtyp							Mutation 1310:						
	Val	Thr	Gln	Arg	Ser	Lys		Val	Thr	Gln	Gly	Ser	Lys
wt	GTC	ACG	CAA	CGT	AGT	AAG	1310	GTC	ACG	CAA	GGT	AGT	AAG

Wildtyp							Mutation 1441:						
	Ala	Lys	Lys	Asn	Asn	Leu		Ala	Lys	Lys	Lys	Asn	Leu
wt	GCC	AAA	AAA	AAT	AAC	CTT	1441	GCC	AAA	AAA	AAA	AAC	CTT

Wildtyp							Mutation 1462:						
	Val	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr		Val	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr
wt	GTT	GGC	TCC	CTG	GGG	ACA	1462	GTT	GGC	TCC	CCG	GGG	ACA

Wildtyp							Mutation 1579:						
	Pro	Lys	Glu	Glu	Trp	Lys		Pro	Lys	Glu	Asp	Trp	Lys
wt	CCA	AAA	GAA	GAG	TGG	AAA	1579	CCA	AAA	GAA	GAT	TGG	AAA

Wildtyp							Mutation 1591:						
	Glu	Lys	Thr	Ala	Phe	Lys		Glu	Lys	Thr	Ser	Phe	Lys
wt	GAA	AAA	ACA	GCT	TTT	AAG	1591	GAA	AAA	ACA	TCT	TTT	AAG

Bei allen rekombinanten Proteinen zeigten sich in der Sequenzierung der geplante Basenaustausch und somit auch der gewünschte Aminosäureaustausch. Im Umfeld von ca. jeweils 100 bp vor und hinter dem Austausch war die Sequenz ohne weitere Mutationen. Es erfolgte keine komplette Sequenzierung des mutierten Plasmides, da dieses für jedes Plasmid 40-45 Sequenzierungsansätze pro Leserichtung bedeutet hätte. Allerdings war eine unbeabsichtigte Einführung von eventuellen zusätzlichen Mutationen relativ unwahrscheinlich, da für die PCR die *Pfu*-Polymerase verwendet wurde.

Insgesamt wurden neben dem Wildtyp 9 rekombinante FVIII – Proteine exprimiert (Tab. 4).

AS-Austausch	Nukleotid-Austausch
Pro928Arg	CCC → CGC
Val993Leu	GTT → CTT
Glu1038Lys	GAG → AAG
Asp1241Glu	GAC → GAG
Arg1310Gly	CGT → GGT
Asn1441Lys	AAT → AAA
Leu1462Pro	CTG → CCG
Glu1579Asp	GAG → GAT
Ala1591Ser	GCT → TCT

Tab. 4: Basen- und Aminosäureaustausch der mittels Mutagenese hergestellten rekombinanten FVIII-Proteine. Der Aminosäureaustausch wird wie folgt angegeben: 1. Spalte: Aminosäure Wildtyp / Aminosäureposition / ausgetauschte Aminosäure, 2. Spalte: Basen original → Basen verändert.

3.3 Expression des FVIII-Wildtyps und der FVIII-Mutanten in Zellkultur

Zur Expression von FVIII-Wildtyp und FVIII-Mutanten wurden die Plasmide mittels Elektroporation in CHO- (Chinesische Hamster Ovar) Zellen eingeführt (transfiziert). Da diese zum Wachstum ein Medium benötigten, dass 10% fötales Kälberserum (FKS) enthielt, wurde dieses - um auszuschließen, dass aktive Proteasen des FKS mit den sezernierten FVIII-Proteinen reagierten – durch Hitze inaktiviert. Am effektivsten für die Transfektion erwies sich der Ansatz mit 20 - 25 µg Plasmid auf 1×10^6 CHO-Zellen. Der Transfektionsansatz wurde nach Elektroporation 48 Stunden mit Normalmedium ohne Wechsel inkubiert, damit sich die Zellen vom Stress der Elektroporation erholen konnten. Nach dieser Ruhephase wurde dem Zellmedium Geneticin zugesetzt, so dass nur die Zellen weiter gewachsen sind, die das Plasmid und somit die Geneticin-Resistenz enthielten. Die Selektionsphase dauerte in der Regel 14-20 Tage, da das verwendete Geneticin nicht zytotoxisch, sondern zytostatisch wirkte (s. 2.3.5).

Im Anschluss erfolgte die "Vereinzelung der Zellen" zur Herstellung eines stabilen Klonen, d.h., es sollte eine Kultur aus einer einzigen Zelle entstehen. Hierfür wurden ca. 60 Zellen auf eine 96-well-Platte verteilt, und durch die tägliche mikroskopische Kontrolle wurde genau protokolliert, wie sich die Zellen entwickelten. Nach einer kurzen Anlaufphase von ca. 4-5 Tagen war die Teilungsrate vergleichbar mit untransfizierten CHO-Zellen. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie in die nächst größere Inkubationseinheit überführt. Die Prozedur wurde insgesamt 7-mal bis zu einer maximalen Kulturschalengröße von 25 ml (über 24-, 12-, 6- well Platten, sowie 5 ml, 15 ml Kulturschalen) (s. 2.3.6 und 2.3.7) durchgeführt.

3.4 Experimentelle und funktionelle Charakterisierung des FVIII-Wildtyps und der FVIII-Protein-Varianten

Nachdem die Zellen in der 25 ml Kulturschale komplett konfluent waren, wurde jeweils nach 24 und nach 48 Stunden eine Probe entnommen, ohne dass es zwischenzeitlich zu einem Mediumwechsel kam. Es folgte eine sofortige FVIII-Aktivitäts- und Antigen- Bestimmung. In den Aktivitäts- und Antigen- Bestimmungen

wurden sowohl die Medienüberstände als auch die Zell-Lysate eingesetzt (nach 48 Std.). Die Bestimmung der FVIII-Aktivitäten erfolgte chromogen über 2 verschiedene Testsysteme, um eventuelle Fehler durch Verdünnungen (im Electra und manuell) zu vermeiden (s. 2.4.1).

Aus den Daten der experimentellen Bestimmung der Aktivität und des Antigengehaltes wurde, für jeden unterschiedlichen CHO-Klon, die spezifische Aktivität und das Sekretionsverhalten ermittelt.

3.4.1 Aktivitätsbestimmung

Nach 48 Stunden wurde das Medium abgenommen. Gleichzeitig wurden die Zellen mit 1 ml NP-40 Puffer lysiert, abzentrifugiert und der Überstand ebenfalls in den Test eingesetzt. So sollte die Menge an FVIII, die noch nicht sezerniert worden war, sich also noch in der Zelle befand, bestimmt werden. Die Bestimmungen der FVIII-Aktivität (FVIII:C) erfolgte über 2 chromogene Testsysteme, die beide über das gleiche Prinzip den FVIII nachweisen (s. 2.4.1). Die Messungen erfolgten in %, wobei 100% als 1 U/ml definiert waren.

Zur Bestimmung der FVIII:C erfolgte sowohl bei dem Aktivitätstest Electra (s. 2.4.1.1) als auch bei der manuellen Messung über den Immuno FVIII:C Kit (s. 2.4.1.2) eine Doppelbestimmung. Die in den beiden Testsystemen ermittelten Werte waren ähnlich. Aus allen FVIII:C Einzelwerten wurde der Medianwert ermittelt (s. Tabelle 5 und Abb. 19).

Anhand der bestimmten FVIII:C-Werte (Tab. 5) wurden die Proteinvarianten in 4 Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: Arg1310Gly und Val993Leu

FVIII:C: Zellmedium 8-10 mU/ml / Zell-Lysat 60-61 mU/ml

Gruppe 2: Glu1038Lys, Asn1441Lys, Glu1579Asp und Ala1591Ser

FVIII:C: Zellmedium 2,5-4 mU/ml / Zell-Lysat 54-58 mU/ml

Gruppe 3: Pro928Arg und Asp1241Glu

FVIII:C: Zellmedium 7,4-8,5 mU/ml / Zell-Lysat 20-38 mU/ml

Gruppe 4: Pro1462Leu

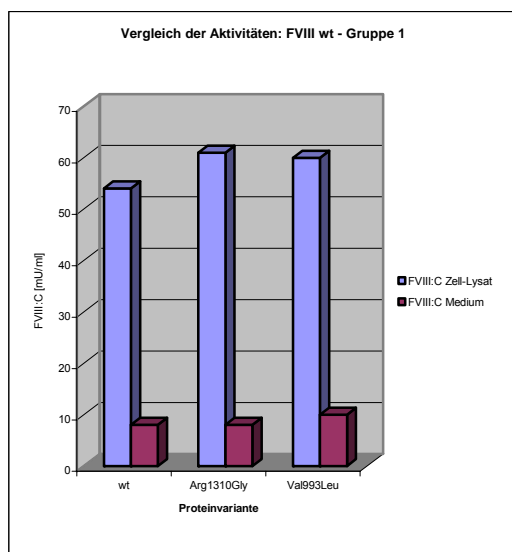
FVIII:C: Zellmedium 0 mU/ml / Zell-Lysat 64 mU/ml

Proteinvariante	FVIII:C _{Medium} [mU/ml] (Electra/Immuno)	FVIII:C _{Zell-Lysat} [mU/ml] (Electra/Immuno)
<u>Wildtyp</u>	8 (7,4 / 8,7)	54 (56 / 52)
<u>Gruppe 1:</u> Arg1310Gly Val993Leu	8 (7,3 / 8,9) 10 (10,9 / 10)	61 (58 / 64) 60 (59 / 61)
<u>Gruppe 2:</u> Glu1038Lys Asn1441Lys Glu1579Asp Ala1591Ser	3,6 (3,8 / 3,4) 2,5 (2,3 / 2,6) 3 (3 / 2,8) 4 (4,1 / 4)	56 (56 / 55) 54 (52 / 55) 56 (57 / 55) 58 (59 / 57)
<u>Gruppe 3:</u> Pro928Arg Asp1241Glu	7,4 (6,8 / 7,9) 8,5 (8,5 / 8,5)	38 (39 / 37) 20 (27 / 12)
<u>Gruppe 4:</u> Pro1462Leu	0 (0 / 0)	64 (62 / 66)

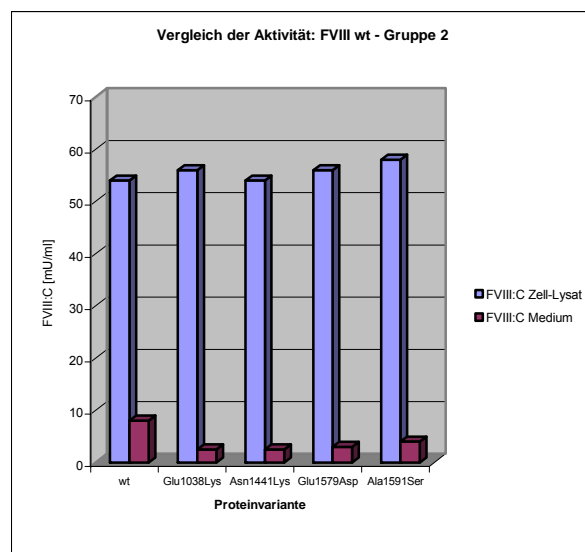
Tabelle 5: Durchschnittliche FVIII-Aktivitätswerte (FVIII:C) der verschiedenen FVIII Proteinvarianten. Der erste Wert in Klammern gibt

den über den Electra ermittelten durchschnittlichen FVIII:C-Wert an, der zweite Wert in Klammern gibt den manuell über Immuno ermittelten durchschnittlichen FVIII:C-Wert an. Jeder FVIII:C-Wert ist der Medianwert aus mindestens 4 FVIII:C Messungen.

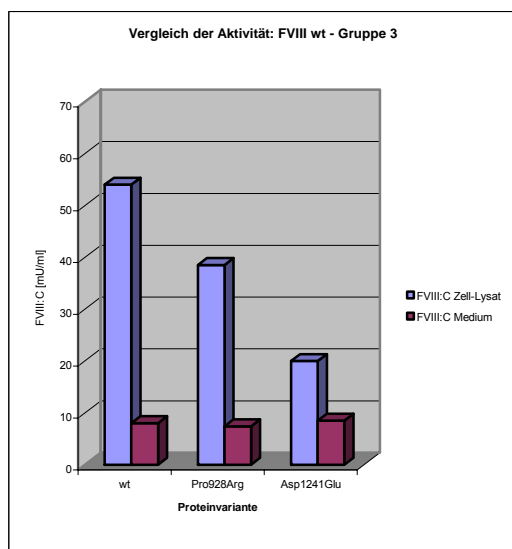
Im Rahmen der Arbeit wurden 2 Transfektionsexperimente mit dem FVIII-Wildtyp durchgeführt. Das rekombinante FVIII/Wt Protein lieferte im ersten und zweiten Transfektionsansatz vergleichbare Werte.



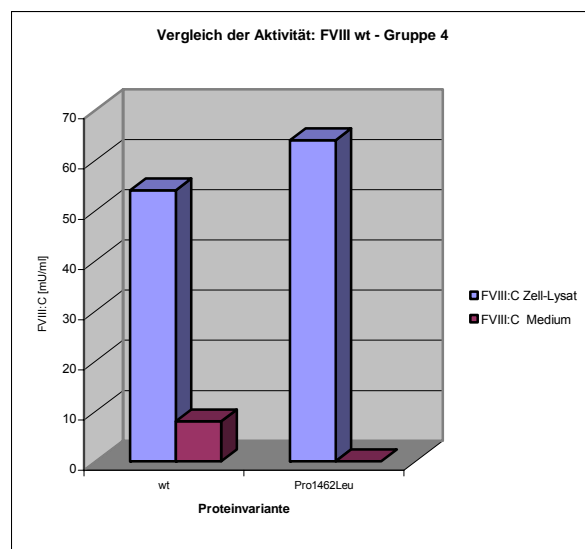
Gruppe 1



Gruppe 2



Gruppe 3



Gruppe 4

Abb. 19: Vergleich der FVIII:C bei den verschiedenen rekombinanten FVIII-Proteinvarianten. Es wurden jeweils die Aktivitäten der im Medium sowie im Zell-Lysat durch Mehrfachmessungen bestimmten Werte aufgetragen.

Der Vergleich der Aktivitätswerte der *Gruppe 1* zeigte, dass die eingeführten Mutationen keinen Einfluss auf die Aktivität der Proteine hatten. Sowohl im Zell-Lysat als auch im Medium waren nur leichte Abweichungen gegenüber dem Wildtyp zu erkennen.

Kaum eine Abweichung zeigten die Werte der Protein Varianten der *Gruppe 2* im Vergleich zur Aktivität vom Wildtyp innerhalb des Zell-Lysates. Die höchste Abweichung in diesem Fall lag bei 7%. Anders sah es bei den Aktivitäten im Medienüberstand aus. Hier war deutlich zu erkennen, dass die mutierten Formen des FVIII-Proteins zum Teil über die Hälfte an Aktivität verloren hatten. Die Protein Varianten Glu1038Lys, Asn1441Lys besaßen nur noch ~ 31% der Aktivität verglichen mit der des Wildtyps. Die Variante Ala1591Ser hatte die höchste Restaktivität in dieser Gruppe von Proteinen mit ~ 50%. Die Proteinvariante Glu1579Asp wies nur noch eine Aktivität von ~ 37,5% auf.

Eine starke Streuung der FVIII:C-Werte im Zell-Lysat bestand bei *Gruppe 3*. Die Aktivität bei Variante Pro928Arg war, im Vergleich zum FVIII-Wildtyp, um 30% im reduziert. Bei der Varianten Asp1241Glu zeigte sich sogar eine Reduktion der Aktivität um 63%. Den gegenüber lagen die Aktivitätswerte im Zellkulturüberstand nah beieinander. Die Abweichungen betrugen nur $\pm 7,5\%$.

Im Zelllysat der *Gruppe 4* (Pro1462Leu) wurde nach Lyse der Zellen eine erhöhte FVIII-Aktivität gegenüber der Wildtyp-FVIII-Aktivität von 18,5% nachgewiesen. Im Medienüberstand dagegen wurde bei allen Messungen weder Aktivität noch Antigen nachgewiesen. Das Protein wurde von den CHO Zellen nicht sezerniert.

Zusammenfassend waren folgende Tendenzen festzustellen:

Die bei Gruppe 1 bestimmten Aktivitäten lagen im Zell-Lysat sowie im Zellkulturüberstand im Bereich der FVIII:C des Wildtyps. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der Analyse der Aktivität im Zell-Lysat der Gruppe 2, allerdings war die FVIII:C im Medienüberstand nur halb so hoch wie beim Wildtyp. Umgekehrt verhielten sich die Messergebnisse bei Gruppe 3: nur 20-50% der Aktivität des Wildtyps wurden im Zell-Lysat detektiert, wobei der FVIII:C Gehalt im Medienüberstand vergleichbar war mit dem normalen FVIII. Bei Gruppe 4 wurde im Zell-Lysat ungefähr die gleiche Aktivität wie die des FVIII Wildtyps bestimmt. Im Medienüberstand wurde keine FVIII:C nachgewiesen.

3.4.2 Antigenbestimmung

Um nicht nur die Aktivität, sondern auch die Menge an rekombinantem Protein im Zellkulturüberstand sowie in den Zellen nachzuweisen, wurden jeweils 200 µl der entnommenen Proben des Zellmediums und des Zell-Lysates in einem Antigen-ELISA (s. 2.4.2) eingesetzt. So konnte auch synthetisiertes, aber inaktives bzw. geringer aktives Protein nachgewiesen werden. Für die Bestimmung der FVIII:Ag-Konzentration in der Zelle wurden diese, nach dem letzten Mediumwechsel, nach 48 Stunden geerntet. Nach Zentrifugation, Lyse und erneuter Zentrifugation konnte das nun im Überstand befindliche FVIII-Protein im FVIII-ELISA detektiert werden.

Die FVIII:Ag-Messungen wurde in % angegeben, wobei 100% als 1 U/ml FVIII:Ag definiert waren. Das entspricht der Konzentration des FVIII-Proteins im humanen Plasma von 0,15 µg/ml. Die anhand der Aktivität vorgenommene Gruppeneinteilung bestätigte sich bei der bestimmten Antigenkonzentration, weil die FVIII:Ag Werte der Proteinvarianten den FVIII:C-Werten sehr ähnlich waren (Tab. 6 und Abb. 20).

Proteinvariante	FVIII:Ag _{Medium} [ng/ml]	FVIII:Ag _{Zell-Lysat} [ng/ml]
<u>Wildtyp</u>	1	7,5
<u>Gruppe 1:</u> Arg1310Gly Val993Leu	1,2 1,7	8 9,5
<u>Gruppe 2:</u> Glu1038Lys Asn1441Lys Glu1579Asp Ala1591Ser	0,7 0,5 0,5 0,7	9,7 7,6 8,7 9,2
<u>Gruppe 3:</u> Pro928Arg Asp1241Glu	0,5 0,8	4 2
<u>Gruppe 4:</u> Pro1462Leu	0	10,7

Tabelle 6: Durchschnittliche FVIII-Antigenkonzentration (FVIII:Ag) der rekombinanten FVIII-Protein-Varianten exprimiert in CHO Zellen. Jeder FVIII:Ag ist der Medianwert aus mindestens 4 FVIII:Ag Messungen.

Im graphischen Vergleich der rekombinanten mutierten Protein-Varianten mit dem Wildtyp werden die Unterschiede der einzelnen Gruppen deutlich (Abb. 20).

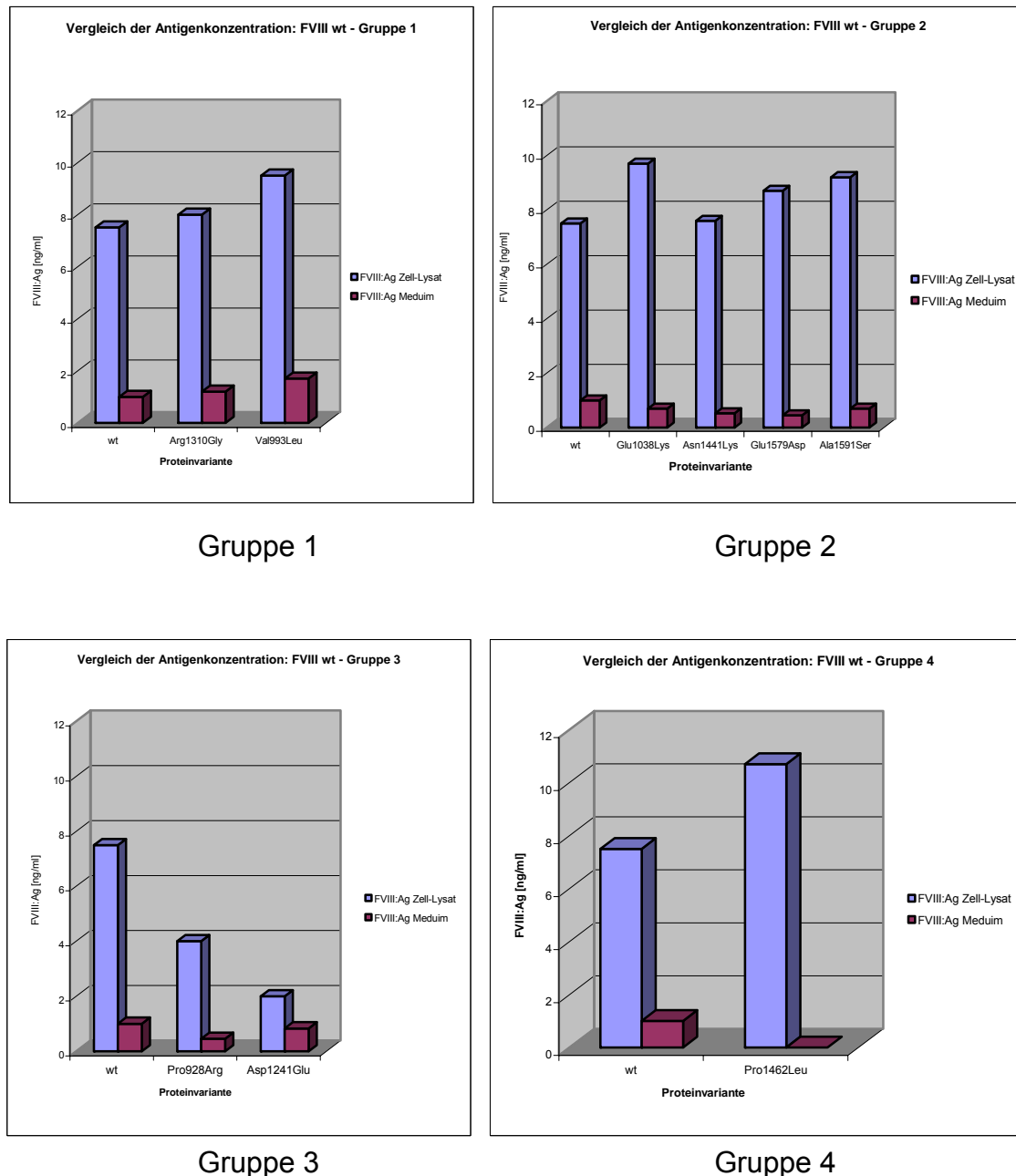


Abb. 20: Vergleich der FVIII:Ag bei den verschiedenen rekombinanten FVIII-Proteinvarianten. Es wurden jeweils die Antigenkonzentrationen der im Medium sowie im Zell-Lysat durch Doppelmessungen bestimmten Werte aufgetragen.

Beim Vergleich der Antigenkonzentration der *Gruppe 1* mit dem Wt FVIII zeigte sich, dass es bei der Proteinvarianten Arg1310Gly im Zell-Lysat sowie im Medienüberstand zu einem geringfügig höherem FVIII Spiegel im Vergleich zum Wildtyp kam. Die bestimmten Werte lagen allerdings, wie auch schon bei den

bestimmten Aktivitäten, im Bereich der Werte des Wildtyps. Die Erhöhung der FVIII:Ag bei der Varianten Val993Leu war höher, sowohl im Zell-Lysat als auch im Zellkulturüberstand. Im Zell-Lysat war der Antigenlevel 27% höher als beim Wildtyp, im Medienüberstand 70%.

Bei allen Proteinvarianten der *Gruppe 2* waren die Werte für den Antigengehalt im Zell-Lysat im Durchschnitt höher als beim Wildtyp, bei der Protein-Variante Glu1038Lys sogar um ~ 30%. Der Antigengehalt im Medienüberstand war im Vergleich zum Wildtyp geringer. Bei den Protein-Varianten Glu1038Lys und Ala1591Ser lag die Reduktion bei 30%. Die Protein Varianten Asn1441Lys und Glu1579Asp hatten einen Restantigengehalt von 53% bzw. 45%.

Der Vergleich der Antigen-Gehalte der FVIII Mutanten der *Gruppe 3* mit dem Wildtyp im Zell-Lysat zeigte wesentlich niedrigere Werte für die Proteinvarianten. So betrug der Antigengehalt für die FVIII-Variante Pro928Arg nur 53%, für die Variante Asp1241Glu nur 27% des FVIII/Wt Antigengehaltes. Im Medienüberstand war die Antigenkonzentration ebenfalls niedriger als die des Wildtyps. Sie betrugen für Pro928Arg 50% und für Asp1241Glu 80% des Wildtyp.

Beim Vergleich der Antigengehalte der *Gruppe 4* mit dem Wildtyp zeigte sich ebenfalls ein ähnliches Bild wie bei den Aktivitäten. Der Wert für den Antigengehalt der Proteinvariante Pro1462Leu war im Vergleich zum Wildtyp im Zell-Lysat um 43% höher. Im Medienüberstand fehlte das Protein gänzlich.

Zusammenfassend war festzustellen, dass in Gruppe 1 im Wesentlichen ähnlich viel FVIII:Ag exprimiert und auch von den Zellen sezerniert wurde wie beim Wildtyp. Der Vergleich des Antigengehaltes der Gruppe 2 mit dem des Wildtyp zeigte einen vergleichbaren Antigengehalt im Zell-Lysat und einen niedrigeren Antigen-Spiegel im Zellkulturüberstand. Zu einer Reduktion der Antigenkonzentration kam es bei den Proteinvarianten der Gruppe 3 im Zell-Lysat sowie im Medium. Bei Gruppe 4 war im Zell-Lysat der Antigengehalt im Vergleich zum normalen FVIII höher, dagegen wurde im Medienüberstand kein Antigen nachgewiesen.

3.4.3 Spezifische FVIII Aktivität

Für den FVIII Wildtyp und alle rekombinanten Proteinvarianten wurden sowohl die Aktivität als auch die Antigenkonzentration (s. 3.4.1 und 3.4.2) bestimmt. Dabei erfolgten die Bestimmungen aus demselben Aliquot. Die bestimmte Aktivität wurde ins Verhältnis zu dem in derselben Probe detektierten Antigen gesetzt (FVIII:C/FVIII:Ag). Dieses Verhältnis, die spezifische Aktivität, erlaubte eine Aussage über die Aktivität des jeweiligen Proteins im Verhältnis zu seiner vorhandenen Antigenmenge. Da bei der gesunden Bevölkerung die Aktivität im Durchschnitt 1 U/ml und der dazugehöriger FVIII:Ag 0,15 µg/ml beträgt, ergibt sich für die spezifische Aktivität im Poolplasma ein Idealwert von 6,67 U/µg.

Von den einzelnen Werten wurde der Medianwert ermittelt. Die nachfolgende Graphik (Abb. 21) zeigt die Ergebnisse der einzelnen Gruppen, jeweils im Vergleich zum FVIII-Wildtyp.

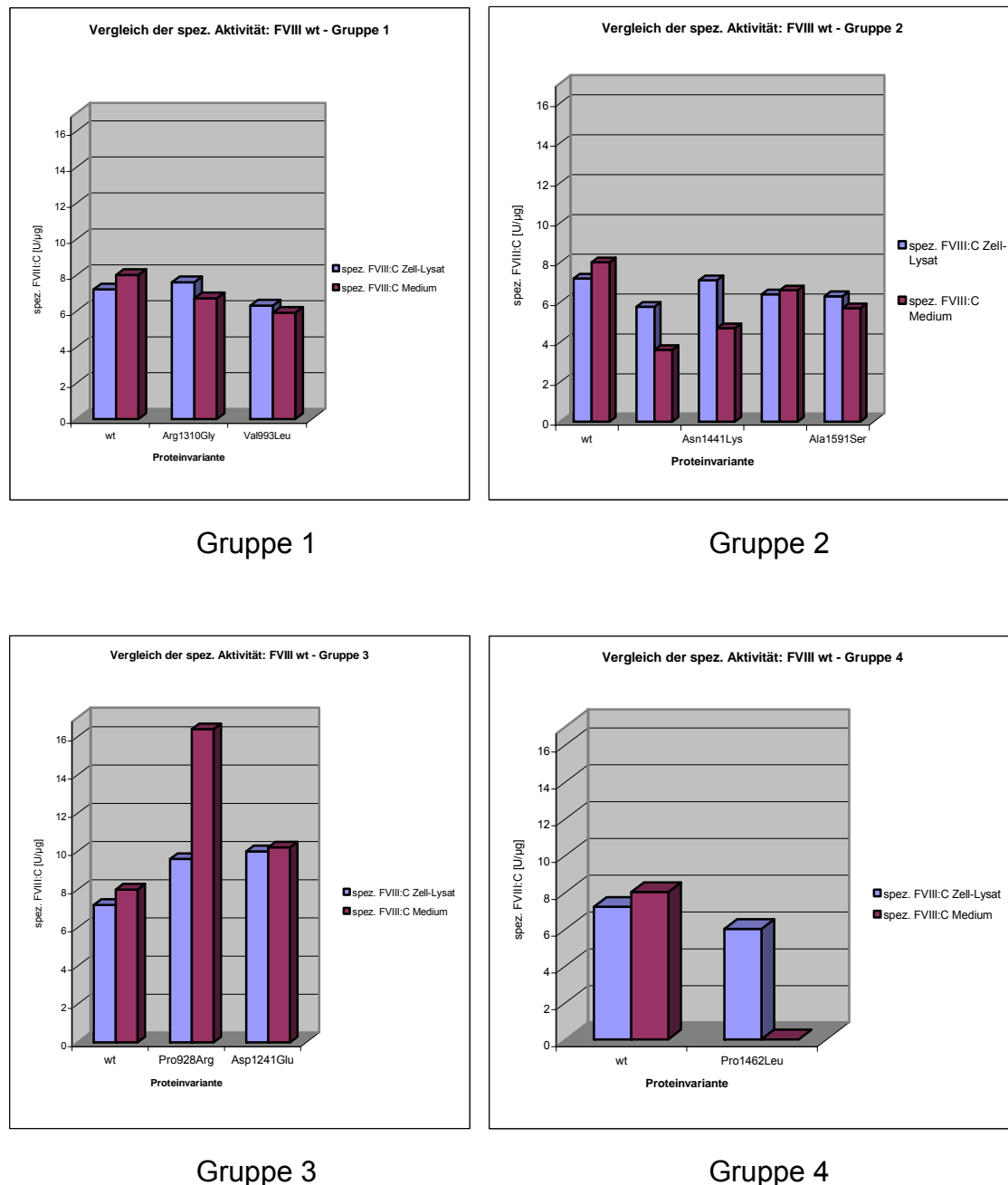


Abb. 21: Spezifische Aktivitäten im Vergleich. Es wurden jeweils die Aktivitäten der im Medium sowie im Zell-Lysat bestimmten Werte aufgetragen.

In *Gruppe 1* waren die spezifischen Aktivitäten der Proteine im Zell-Lysat sowie im Medienüberstand mit der des Wildtyps vergleichbar, d.h., dass diese Mutationen keinen Einfluss auf die Funktion und die Expression der Proteine hatten. Auch der Vergleich der spezifischen Aktivität innerhalb der einzelnen Proteinvarianten zeigte

keinen deutlichen Unterschied bei der sezernierten (Medienüberstand) und der im Zell-Lysat nachgewiesenen Form.

Bei den Proteinvarianten der *Gruppe 2* gab es im Zell-Lysat keine auffälligen Veränderungen. Nur die Proteinvariante Glu1038Lys war in der spezifischen Aktivität reduziert. Asn1441Lys zeigte hier gegenüber dem Wildtyp sogar eine 99 %ige Übereinstimmung. Anders sah die Situation im Medienüberstand aus. Im Vergleich zum Wildtyp war die größte Abweichung bei der spezifischen Aktivität mit 55% bei der Mutation Glu1038Lys zu sehen. Bei den anderen Varianten in dieser Gruppe waren die Abweichungen zwischen -42% (Asn1441Lys) und -17,5% (Glu1579Asp). Auffällig war, dass sich bei zwei Proteinvarianten (Glu1038Lys und Asn1441Lys) die Werte für die spezifische Aktivität der im Medienüberstand und der im Zell-Lysat nachgewiesenen Form um 40% unterschieden.

Beim Vergleich der spezifischen Aktivitäten innerhalb der *3. Gruppe* zeigte sich eine generelle Erhöhung der spezifischen FVIII-Aktivitäten im Zell-Lysat und im Zellkulturüberstand gegenüber dem FVIII/Wt. Im Zell-Lysat war die spezifische Aktivität der Proteinvariante Pro928Arg um 33% höher als der Wildtyp, die Proteinvariante Asp1241Glu war um 38% erhöht. Im Medienüberstand kam es bei der Proteinvariante Pro928Arg sogar zu einer Verdoppelung der spezifischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die Proteinvariante Asp1241Glu hatte einen um 27,5% erhöhten Wert. Auffällig war der Unterschied der spezifischen Aktivität bei der sezernierten und nicht-sezernierten Form der Proteinvarianten Pro928Arg. Die Abweichung untereinander betrug 42%.

Die Abweichung der spezifischen Aktivität des Proteins aus der *4. Gruppe* im Zell-Lysat war mit -10% nur minimal. Da diese Proteinvariante nicht sezerniert wurde, waren keine Werte über die spezifische Aktivität im Medienüberstand ermittelbar.

Es zeigte sich beim Vergleich der spezifischen Aktivitäten der rekombinanten Proteinvarianten mit der des Wildtyps, dass es bei Gruppe 1 nur zu geringfügigen Abweichungen kam, bei Gruppe 2 die Werte generell geringer waren und bei Gruppe 3 generell höher. Bei 3 Proteinen (Glu1038Lys, Asn1441Lys und Pro928Arg) zeigten

sich Unterschiede in der spezifischen Aktivität bei der sezernierten und nicht-sezernierten Form.

3.4.4 Sekretionsverhalten

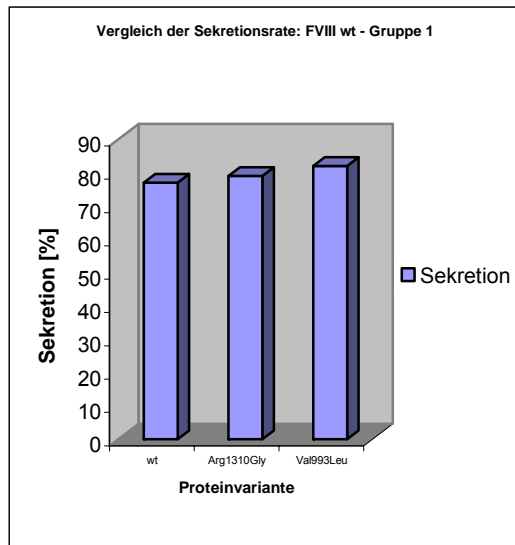
Um das Sekretionsverhalten der jeweiligen Proteinvarianten zu studieren, wurde nach 48 Stunden eine Medienprobe entnommen. Nach der dieser Entnahme wurden die Zellen trypsiniert und nach Zentrifugation lysiert. Anhand der Gesamtmenge (Σ_{FVIII} Medienüberstand + Zell-Lysat) konnte der sezernierte Anteil ($FVIII:Ag_{\text{Medium}}$) bestimmt werden.

In der folgenden Tabelle (Tab. 7) ist für alle Proteinvarianten die gesamt exprimierten FVIII-Proteinmengen (Medienüberstand + Zell-Lysat) aufgeführt und dem Anteil an FVIII:Ag im Zellkulturüberstand gegenübergestellt. Das Volumen des Zellkulturmediums betrug in allen Fällen 25 ml. In dem Antigen ELISA wurde der FVIII:Ag pro ml bestimmt. Um eine Aussage über das Sekretionsverhalten treffen zu können, erfolgte eine Hochrechnung auf die Gesamtvolumenmenge. Die Sekretionsrate bezog sich auf einen Zeitraum von 24 Stunden. Da der FVIII zur Stabilisierung den „von-Willebrand-Faktor“ (vWF) benötigt, wurde dieser der Zellkultur durch 10% FKS zur Verfügung gestellt.

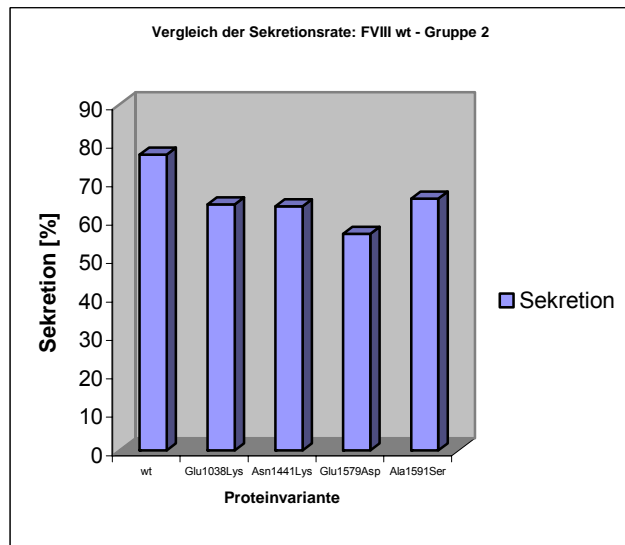
Proteinvariante	FVIII:Ag_{gesamt} [ng]	FVIII:Ag_{Medium} [ng bzw. (%)]
<u>Wildtyp</u>	32,5	25 (77)
<u>Gruppe 1:</u> Arg1310Gly Val993Leu	38 52	30 (79) 42,5 (82)
<u>Gruppe 2:</u> Glu1038Lys Asn1441Lys Glu1579Asp Ala1591Ser	27,2 20,9 20 26,7	17,5 (64) 13,3 (64) 11,3 (57) 17,5 (66)
<u>Gruppe 3:</u> Pro928Arg Asp1241Glu	15,3 22,8	11,3 (74) 20,8 (91)
<u>Gruppe 4:</u> Pro1462Leu	10,7	0 (0)

Tab. 7: FVIII:Ag im Medium und im Zell-Lysat. Dargestellt ist in der ersten Spalte die Gesamtmenge des FVIII:Ag, die sich aus der im Medienüberstand und im Zell-Lysat bestimmten Menge an Antigen zusammensetzt (wird jeweils als 100% gesetzt). Die zweite Spalte zeigt den Anteil an FVIII:Ag, der in 25 ml Medium nachgewiesen wurde und, diesen Anteil auf die Gesamtmenge bezogen, in % ausgedrückt (). Dieser prozentuale Anteil wird im Folgenden als Sekretionsrate bezeichnet.

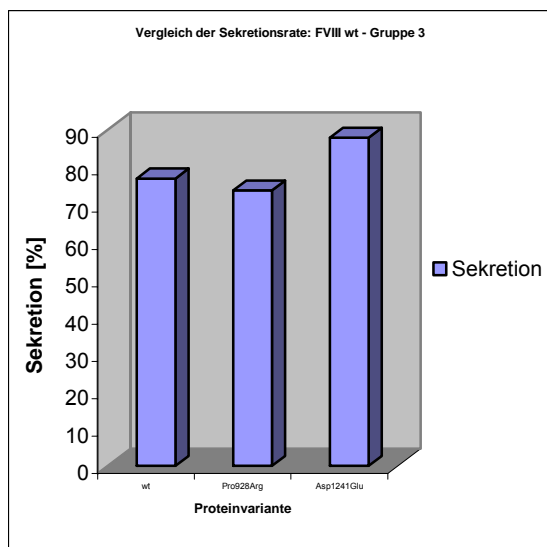
Im Folgenden (Abb. 22) sind die Sekretionswerte (Anteil FVIII:Ag im Medium) im Vergleich der einzelnen Gruppen zum Wildtyp dargestellt:



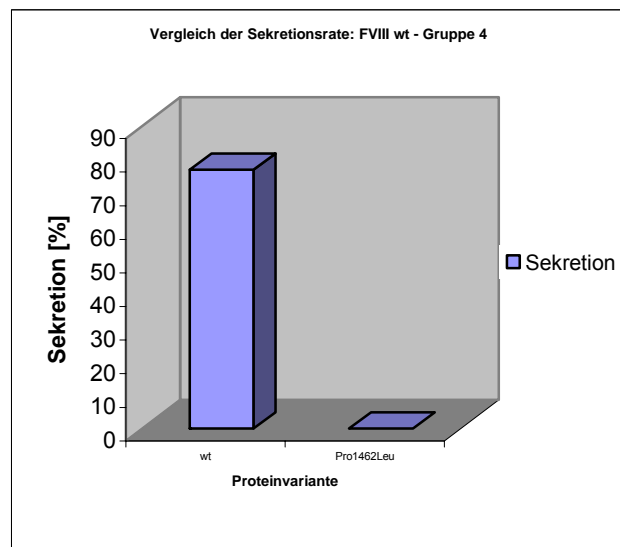
Gruppe 1



Gruppe 2



Gruppe 3



Gruppe 4

Abb. 22: Sekretionsverhalten der verschiedenen FVIII-Proteinvarianten im Vergleich zum FVIII-Wildtyp. Ermittelt wurde der sekretierte, prozentuale Proteinanteil der jeweiligen FVIII-Proteinvarianten.

Die Sekretion in *Gruppe 1* im Vergleich mit dem Wildtyp schien von den Mutationen nicht beeinflusst zu sein, da sich die Sekretionsrate der drei Proteinvarianten nur um max. 5% voneinander unterschieden.

Bei der Sekretionsrate der 2. *Gruppe* waren die Werte für die Mutanten tendenziell im Vergleich zum Wildtyp niedriger. Während der Wildtyp eine Sekretionsrate von 77% aufwies, zeigten die Proteinvarianten Sekretionsraten zwischen 56% und 66%. In diesem Fall schienen die Mutationen einen gewissen Einfluss auf die Sekretion der Proteine zu haben.

Die Sekretionsrate der Mutation Asp1241Glu betrug 87,9% und war somit höher als die der des Wildtyps (Sekretionsrate: 77%). Für die Mutation Pro928Arg kam es zu einer Reduktion der Sekretion, sie lag bei 73,8%. Für die Proteine der 3. *Gruppe* ließ sich somit keine einheitliche Aussage treffen.

Die FVIII Protein Variante der *Gruppe 4* (Leu1462Pro) konnte im Medienüberstand nicht nachgewiesen werden und wurde somit von den CHO-Zellen nicht ins Medium sezerniert.

Insgesamt stellte man fest, dass bis auf die Mutation Pro1462Leu alle rekombinanten Proteine sezerniert wurden. Die höchste Sekretion zeigte dabei die Gruppe 1. Die Proteinvariante Asp1241Glu wurde von allen untersuchten Proteinen am besten sezerniert.

4. Diskussion

Die Bedeutung der B-Domäne des FVIII-Proteins ist bis heute nicht genau geklärt. Das wesentliche Ziel der Arbeit war, die Rolle der B-Domäne näher zu untersuchen. Bekannt ist, dass die B-Domäne für die eigentliche Aktivität des Proteins keine Rolle spielt, da sie im Laufe der Prozessierung und Aktivierung herausgeschnitten wird (Toole et al., 1986) und sich das aktive Protein aus den Domänen A1-A2-A3-C1-C2 zusammensetzt. Daher können Hämophilie-A-Patienten auch mit einem Gerinnungskonzentrat, das den FVIII ohne B-Domäne enthält, erfolgreich therapiert werden.

Mehrere Gruppen haben Mitte der 80er Jahre FVIII-Proteine mit unterschiedlichen B-Domänen-Deletionen bzw. verkürzten B-Domänen rekombinant exprimiert (Eaton et al, 1986; Sarver et al, 1987; Meulien et al, 1988; Langner et al, 1988; Toole et al 1986; Pittman et al, 1993; Sandberg et al, 1995; Donath et al, 1995). Alle Gruppen stellten fest, dass es ohne die B-Domäne zu einer Erhöhung des Expressionsniveau bis zum 17fachen kam. Verantwortlich dafür war eine höhere Menge an mRNA und somit auch der Translationsprodukte (Pittman et al., 1993; Dorner et al., 1987). Die Verkürzung der B-Domäne wirkte damit den im FVIII Protein natürlich vorhandenen inhibitorischen Sequenzen entgegen, die durch Einfluss auf das mRNA-Transkript die Expression beeinflussen. Diese befinden sich in der A1- und A2- Domäne und umfassen die Nukleotide 1375-2277. Diese Sequenzabschnitte reduzieren die mRNA- Menge um das bis zu 10fache (Lynch et al, 1993; Hoebe et al, 1995).

Eine Möglichkeit zur Klärung der Rolle der B-Domäne ist die Betrachtung der Mutationsverteilung im FVIII-Gen und deren Auswirkungen auf die funktionellen Eigenschaften des Proteins. Im Rahmen des Deutschen Humanen Genom Projektes untersuchte ein Konsortium die unmittelbare Ursache der Hämophilie A mittels Hochdurchsatz-Mutationsscreening und Sequenzieretechniken. Zurzeit umfasst das untersuchte Kollektiv 2050 Hämophilie-A-Patienten. Anhand der Auswertung der Daten zeigte sich, dass sich bei der schweren Form der Hämophilie A in 98,5% der Fälle ursächliche Mutationen im FVIII-Gen nachweisen lassen.

In einer Studie von Oldenburg et al. (2003) wurde die Mutationsverteilung bei 645 Patienten mit schwerer Verlaufsform der Hämophilie A untersucht. Dabei stellte sich

heraus, dass die Intron-22-Inversion, die ein Auseinanderreißen des Faktor VIII-Gens bewirkt, den Hauptanteil an Mutationen (~ 50%) ausmacht, gefolgt von kleinen Deletionen/Inversionen (14,1%), Stop-Mutationen (12,8%) und Missense-Mutationen (12,7%). Große Deletionen kamen in 4% der Fälle vor, Spleißstellenmutationen in 3,5% und Intron 1 Inversionen, die ebenfalls das FVIII-Gen auseinander reißen, sogar nur in 1,2%. Bei 1,5% der Patienten waren keine Mutationen – auch nach Komplettssequenzierung - diagnostiziert worden (Klopp et al., 2002; Uen et al., 2003).

Bei der näheren Betrachtung der Mutationsverteilung in der B-Domäne fällt auf, dass im Bereich innerhalb der Thrombinschnittstellen (90% der FVIII-B-Domäne) Missense-Mutationen sehr selten sind, obwohl die B-Domäne 40% des reifen FVIII-Proteins ausmacht. Insbesondere die CpG-Dinukleotide, die als Mutationshotspot bekannt sind und an denen in dem übrigen FVIII-Protein 40% der Mutationen liegen, sind in der B-Domäne praktisch nicht von Missense-Mutationen betroffen. Im Gegensatz dazu sind andere Mutationstypen, wie kleine Deletionen/Insertionen, die zu trunkierten Proteinen führen, in der B-Domäne in der zu erwarteten Häufigkeit zu finden. Diese Ergebnisse der Mutationsanalysen zeigen, dass Missense-Mutationen in der B-Domäne ganz offensichtlich selten oder gar nicht zu einem hämophilen Phänotyp führen. Damit vereinbar ist, dass die B-Domäne nicht zur FVIII-Proteinaktivität beiträgt und daher Veränderungen einzelner Aminosäuren offensichtlich ohne Konsequenz für die Proteinfunktion sind. Andererseits würde man erwarten, dass Missense-Mutationen an Glykosylierungsstellen (Asparaginsäure-Mutationen) die Sekretion des FVIII-Proteins beeinflussen, weil die Glykosylierungen bei den Wechselwirkungen mit Chaperonen für die Sekretion notwendig sind.

Bei Kaukasiern sind nur 2 Polymorphismen in der B-Domäne des FVIII-Gens beschrieben. An der Aminosäureposition Ser1269Ser mit einer Frequenz von 0,937/0,063 (Klopp et al., 2002) und an der Aminosäureposition Asp1241Glu mit einer Frequenz von 0,73/0,27 (Gitschier et al., 1984; Higuchi et al., 1991b; Lin et al., 1993). Es ist erstaunlich, dass lediglich 2 Polymorphismen („Single Nucleotide Polymorphisme“, SNP) in der B-Domäne auftreten, diese also höchst konserviert ist, was, trotz Nicht-Beteiligung an der FVIII-Aktivität, auf eine wichtige Bedeutung der B-Domäne hinweist. Ganz offensichtlich werden SNPs in diesem Bereich nicht toleriert.

Diese Befunde stehen scheinbar im Widerspruch zueinander. Beide Aspekte wollten wir näher in unserer Arbeitsgruppe untersuchen. Hinsichtlich der Verteilung von SNPs haben wir 560 Allele von gesunden Blutspendern untersucht und neben den beiden bekannten Polymorphismen lediglich 6 weitere Allelvarianten an 5 Positionen gefunden (Tab. 8), wobei es nur bei 3 SNPs zu einem Aminosäureaustausch kam (*). Die Häufigkeit der SNPs ist also auch in dieser Untersuchung sehr gering, was die Vermutung einer funktionellen Bedeutung der B-Domäne bestärkt. Schließt man die beiden häufigen Polymorphismen an den Aminosäurepositionen 1241 und 1269 aus, ist in der B-Domäne nur 1 von 250 000 Basenpaaren (6 von 1 512 600 bp) verändert.

Codon	Nukleotid-Position	Aminosäure-Austausch	Frequenz absolut	Frequenz
794	2439	Leu>Leu	1/560	0,0018/0,998
831	2550	Leu>Leu	1/560	0,0018/0,998
981	2998	Pro>Ser*	2/560	0,0036/0,996
1038	3170	Glu>Ala*	1/560	0,0018/0,998
1241	3780	Asp>Glu*	151/560	0,27/0,73
1269	3864	Ser>Ser	39/560	0,07/0,93
1667	5058	Thr>Thr	1/560	0,0018/0,998

Tab. 8: Verteilung von Polymorphismen (SNP) in der FVIII-B-Domäne bei 330 Blutspendern. Die absolute Frequenz zeigt die gefundene Anzahl an Polymorphismen pro 560 untersuchter Allele an. Bei 3 Polymorphismen kam es zum Aminosäureaustausch (*).

Es scheint ein hoher Selektionsdruck zu bestehen, der die Entstehung einer großen Anzahl an SNPs offensichtlich verhindert.

Diese Daten unterstreichen sehr eindrucksvoll die hohe Konserviertheit der B-Domäne beim Menschen. Allerdings existiert eine hohe Variabilität zwischen den B-Domänen verschiedener Spezies und zwischen den B-Domänen von FVIII und FV (Abb. 23). Beide Proteine katalysieren in sehr ähnlichen Proteinkomplexen, mit Hilfe von Calcium und Phospholipiden, die Aktivierungen von Gerinnungsfaktoren an unterschiedlichen Stellen in der Gerinnungskaskade. Der FVIII agiert im Tenase-

Komplex, wo er an der Aktivierung des Faktor X beteiligt ist (s. Abb. 3). Der FV, gebunden im Prothrombinase -Komplex, katalysiert die Aktivierung von Faktor II zu IIa.

Humaner FVIII	B	907 Aminosäuren (AS)
Humaner FV	B	836 AS, keine Homologie zu FVIII human
Hund FVIII	B	905 AS, Homologie 58% zu FVIII human
Maus FVIII	B	880 AS, Homologie 49% zu FVIII human
Schwein FVIII	B	689 AS, Homologie 38% zu FVIII human

Abb. 23: Größen- und Homologievergleich zwischen den FVIII-B-Domänen verschiedener Spezies bzw. des FV des Menschen. Angegeben sind die Anzahl an Aminosäuren und die Homologie zum humanen FVIII.

Zu Beginn unserer Arbeit gab es keine in Expressionsversuche mittels Mutagenese in der B-Domäne des FVIII-Gens, um funktionelle Bereiche oder eine direkte Beteiligung der B-Domäne an der Aktivität des Proteins zu klären. Da uns zu diesem Zeitpunkt nur eine eigene Missense-Mutation innerhalb unserer Mutationsanalysen aufgefallen war, nahmen wir die HAMSTeRS Datenbank zur Hilfe. Hier fanden wir 6 Patienten, bei denen außer einer Missense-Mutation in der B-Domäne keine weiteren Mutationen im FVIII-Gen vorlagen. Die Patienten waren entweder an einer mittelschweren oder schweren Form der Hämophilie A erkrankt. Um zu klären, ob die Mutation, die bei dem Patienten diagnostiziert wurde, tatsächlich kausal für den vorhandenen Phänotyp war, stellten wir Proteinvarianten mittels Mutagenese her und

exprimierten sie in CHO-Zellen. Ziel war es, herauszufinden, ob die veränderten rekombinant exprimierten FVIII-Proteine sich in ihren funktionellen und sekretorischen Eigenschaften vom Wildtyp unterschieden.

4.1 Transfer der Methoden nach Bonn

Zu Beginn der Arbeit fehlte sowohl die Infrastruktur für die geplanten experimentellen Untersuchungen im „Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin“, Universität Bonn, sowie die Methode der in-vitro-Mutagenese für ein so großes Gen wie das FVIII-Gen (7,2 kb). Daher erfolgte ein halbjähriger Aufenthalt in Belgien in der Arbeitsgruppe von Prof. J.-M. Saint-Remy am „Center for Molecular and Vascular Biology“, University of Leuven (Jacquemin et al., 2000) zum Erlernen der Techniken. Der Aufenthalt wurde von der „Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung“ (GTH) im Rahmen eines Stipendiums gefördert.

Bei dem in Belgien verwendeten Vektor (pGCsamFVIII von R. A. Morgan) handelte es sich um ein 11 kb großes Konstrukt, das eine 5 kb große FVIII-cDNA ohne genetische Information der B-Domäne enthielt (FVIII_{Bdd}). Dieser Vektor wurde für die Expressionsstudien der in Leuven untersuchten C- und A- Domänen verwendet. Zur Einführung einer Mutation in diesen Vektor wurde, mittels „Overlapping-PCR“, die Region um den Basenaustausch amplifiziert und, nach einem Restriktionsverdau des Ausgangsvektors und des PCR-Produktes, beide Fragmente ligiert. Der Basenaustausch wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Expression der veränderten FVIII-Proteine erfolgte in CHO-Zellen, die eine gute Ausbeute an Protein lieferten (bis zu 10% FVIII:C). Eine Expression des FVIII-Proteins in Bakterien ist aufgrund seiner Komplexität nicht möglich. Es musste eine rekombinante Expression in einem Zellsystem erfolgen, welches in der Lage war, die rekombinanten Proteine zu synthetisieren, richtig zu falten, mit postrationalen Modifikationen zu versehen, die dem nativen Protein entsprechen und zu sezernieren. Diese Voraussetzungen erfüllen Säugetierzellen; diese können die Glykosylierungen an den Asparagin- und Serinresten vornehmen sowie andere postrationale Modifizierungen, wie proteolytische Prozesse von Propeptiden, γ -Carboxylierung von

Glutaminsäureresten, Hydroxylierung von Asparaginsäure- und Prolinresten und Sulfatierungen von Tyrosinresten durchführen (Kaufman et al., 1992).

Nach Rückkehr aus Belgien sollten diese Methoden in Bonn mit einem, die komplette FVIII-cDNA enthaltenden Expressionsvektor etabliert werden. Die komplette cDNA wurde uns dabei in Form des Expressionsvektors pCI FVIII von Herrn PD Dr. Rainer Schwaab zur Verfügung gestellt (Haack et al., 1999). Nach einigen Versuchen stellten wir fest, dass die in Belgien verwendeten Methoden nicht auf den Vektor übertragbar waren, weil sich, durch das Vorhandensein der B-Domäne, der DNA-Anteil des Vektors um 2,2 kb vergrößert. Dieses hatte zur Folge, dass sich die Anzahl der „Single-Restriction-Sites“, die für das Einfügen des über „Overlapping-PCR“ hergestellten Fragmentes in den Expressionsvektor benötigt wurden, kaum mehr zur Verfügung standen. Es gelang uns zwar die Fragmente mittels PCR herzustellen, allerdings hatten diese, bedingt durch die weit auseinander liegenden Restriktionsseiten, eine Größe von bis zu 4000 kb. Die folgende Ligation mit dem ebenfalls verdauten Ausgangsvektor zeigte trotz mehrfacher Versuche keinen Erfolg. Wir führten daher die Mutagenese mittels des „QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) durch.

Für die erforderlichen zellbiologischen Arbeiten war zunächst die Neueinrichtung eines Zelllabors erforderlich. Nach einigen Anlaufschwierigkeiten und Modifikation der in Leuven erlernten Methoden, ist es uns im Verlauf dieser Arbeit erfolgreich gelungen, ein effektives und stabiles Expressionssystem für rekombinante FVIII-Proteine zu entwickeln und in Bonn zu etablieren, das uns weitere funktionelle Studien von Missense Mutationen ermöglicht.

4.2 Herstellung und Verwendung der Expressionsvektoren

Aufgrund der fehlenden B-Domäne in dem Expressionsvektor pGCsamFVIII, mussten wir einen anderen Vektor verwenden (pCIFVIIIwt). Dieser Wechsel stellte sich im Verlauf der Arbeit als sehr schwierig heraus. Nach Transfektion des Expressionsvektors pCIFVIIIwt zeigte sich, dass das Expressionslevel in CHO Zellen am Rande der Nachweisgrenze ($\leq 1\%$ für FVIII:C und FVIII:Ag) lag und somit der

Expressionsvergleich problematisch war. Auch nach Induktion der Zellen mit Natrium-Butyrate konnten wir kein höheres FVIII-Niveau feststellen. Wir erhielten daraufhin von Dr. Thorsten Tonn (Frankfurt) den Expressionsvektor pcDNA3FVIII (Abb. 15). Dieser enthielt den SV40 Enhancer, der in der Lage war, die Expression von rekombinanten Proteinen um das 2,5-fache zu erhöhen (Dorner et al., 1987 und 1989; Kaufman et al., 1989; Hoebe et al., 1995).

Nach erfolgreicher Mutagenese und Transformation in den mitgelieferten XL Gold Zellen, wurden die Plasmide aus diesen Zellen aufgereinigt und ihre Größe auf einem Agarosegel geprüft. Es war eine nur sehr schwache Bande zu erkennen (s. Abb. 16), die anzeigte, dass die Konzentration des Plasmides nicht für eine Sequenzierung und Transfektion in CHO-Zellen ausreichte. Auch durch eine Maxi-Präparation konnte die Konzentration des Plasmides nicht ausreichend erhöht werden. Um dieses Problem zu beheben, wurden die aus den XL Gold aufgereinigten Plasmide erneut transformiert. Hierfür verwendeten wir Dh5 α Zellen, da wir in vorherigen Versuchen sehr gute Erfahrungen mit dieser Zelllinie gemacht hatten. Die Konzentration erhöhte sich um das 10fache und war somit ausreichend für die folgenden Versuche.

Nach den ersten Transfektionsansätzen zeigte sich, dass das Expressionslevel dieses Vektors zwar gering, aber dennoch für unsere Zwecke ausreichend war.

4.3 Funktionelle Charakterisierung von Missense FVIII Proteinvarianten im Vergleich zum Wildtyp-Protein

Die Auswahl der Missense Mutationen und Polymorphismen erfolgte zum einen aus der HAMSTeR'S Datenbank und zum anderen aus eigenen vorhandenen Daten. Die Mutationen Val993Leu und Glu1579Asp und waren mit einer schweren Form der Hämophilie A assoziiert. Keine Angaben über den Schweregrad waren bei den Proteinvarianten Ala1591Ser und Asn1441Lys vorhanden. Die Variante Glu1038Lys wurde bei einem Patienten mit einer mittelschweren Verlaufsform identifiziert. An der Aminosäureposition 1038 ist zum einen eine Genvariante zu finden, bei der es zu einem Austausch von Glutaminsäure nach Alanin (Ala) (s. Tab. 8) kommt, als auch

eine Missense Mutation mit einer Veränderung von Glutaminsäure nach Lysin (Lys) kommt (Tab. 9). Glutaminsäure (Glu) gehört, wie Lysin, zur Gruppe der Aminosäuren mit geladenen polaren Seitenketten. Alanin dagegen besitzt eine unpolare Seitenkette. Auf den ersten Anschein sind sich Glu und Lys ähnlich, allerdings ist die Ladung der Seitenketten nicht identisch. Glutaminsäure besitzt einen COO^- -Rest, Lysin einen NH_3^+ -Rest. Aufgrund der Assoziation der Glu1038Lys mit einer mittelschweren Verlaufsform der Hämophilie A, haben wir uns für diese Variante entschieden. Bei dem Aminosäureaustausch nach Alanin lag kein hämophiler Phänotyp vor. Bei Leu1462Pro fehlten sowohl die Angaben zu den Laborparametern als auch zum klinischen Verlauf (s. Tab. 9).

Variante	FVIII:C	FVIII:AG	Schweregrad	Referenz
Pro928Arg	2	k.A.	k.A.	Chan et al (1996), (ebenfalls Intron22 Inversion)
Val993Leu	k.A.	k.A.	schwer	Becker et al (1996)
Glu1038Lys	2	10-20	mittel	Higuchi et al (1991a)
Asn1441Lys	6	7	k.A.	McGinniss et al (1993)
Leu1462Pro	k.A.	k.A.	k.A.	McGinniss et al (1993)
Glu1579Asp	< 1	k.A.	schwer	Chuansumrit et al (unpublished)
Ala1591Ser	< 1	k.A.	k.A.	Chan et al (1996)

Tab. 9: Patientenphänotyp und Referenz der natürlich vorkommenden FVIII Proteinvarianten.

k. A. = keine Angaben

Neben diesen nativen Proteinvarianten haben wir auch die Auswirkung von 2 Polymorphismen untersucht. Bei der Proteinvarianten Asp1241Glu handelte es sich um einen der 2 häufigen Polymorphismen in der B-Domäne (Tab. 8). Die Variante Pro928Arg stellt wahrscheinlich ebenfalls einen Polymorphismus dar. Sie wird in der HAMSTeR's Datenbank unter den Punkt-Mutationen geführt, obwohl bei dem betroffenen Patienten ebenfalls eine Intron 22 Inversion diagnostiziert wurde. Die Mutation an der Aminosäureposition Arg1310Gly wurde von uns als eine

Punktmutation erfunden und ausgewählt, da dies ein Beispiel für einen Mutations-Hotspot an CpG-Dinukleotiden darstellt. Diese Genvariante war damit rein artifizieller Natur.

4.3.1 Aktivität, Antigen und spezifische Aktivität

Die funktionelle Charakterisierung der Proteinvarianten erfolgte über die Bestimmung der Parameter für die FVIII-Aktivität und des FVIII-Antigengehaltes. Rechnerisch bestimmte sich daraus die spezifische Aktivität. Durch Untersuchung dieser Parameter im Zell-Lysat und im Medium des Wildtypproteins und der Protein-Varianten, ließen sich Aussagen zum Sekretionsverhalten treffen.

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte über 2 chromogene Testsysteme. Der Vorteil dieser Art der Bestimmung lag in der Verdünnung der Proben mit dem Puffer und damit der Verdünnung von Substanzen aus Medium und Zell-Lysat, welche die Bestimmung stören konnten. In dem Medium war ein pH-Indikator vorhanden, der sich bei niedrigem pH von rot nach gelb verfärbte und anzeigte, dass eine hohe Konzentration an Stoffwechselprodukten im Medium vorhanden war, die sich toxisch auf die CHO-Zellen auswirken konnten. Die rote Farbe verhinderte die Detektion des gelben abgespalteten Farbstoffes. Durch die Verdünnung von 1:41 im Electra, sowie bei dem manuellen Test bei Immuno (s. 2.4.1), störte der Indikator die Bestimmung des FVIII nicht. Für den chromogenen Test sprach ebenfalls der Einsatz von wenig Volumen (min. 180 µl), um die FVIII-Aktivität zu bestimmen.

Anhand der Aktivität der veränderten FVIII-Proteine war zu erkennen, ob sie durch Thrombin aktiviert werden konnten und somit in der Lage waren, die Reaktion von FX zu FXa zu katalysieren. Die durchschnittliche Normalaktivität von FVIII in der Bevölkerung wird mit 100% angegeben. Dies entspricht einem Wert von 1 U/ml. Allerdings treten physiologische Schwankungen zwischen 50 – 200% in der Normalbevölkerung auf, ohne dass ein Krankheitswert vorliegt. Unser rekombinant hergestelltes FVIII/Wt Protein hatte im Medienüberstand eine Aktivität von ~8 mU/ml (0,8%).

An den Werten des vorhandenen Antigengehaltes konnte eine Aussage über die exprimierte Proteinmenge und, in Verbindung mit der Aktivitätsbestimmung, über die spezifische Aktivitäten der jeweiligen Proteinvarianten getroffen werden. Die FVIII:Ag-Konzentration im Medienüberstand betrug im Durchschnitt 1 ng/ml. Auch hier ist der Wert im Vergleich zum Menschen (150 ng/ml) stark verringert. Allerdings ist die Überproduktion von Proteinen ohne Aufreinigung und Ankonzentration sehr schwierig und mit dem Risiko verbunden, dass eine weitere Behandlung der Proteine mit dem Verlust an Aktivität der Enzyme einhergehen kann. Aus diesem Grund wurde auf diese Schritte in der Arbeit bewusst verzichtet.

Die spezifische Aktivität ist definiert als der „Quotient aus Aktivität und der dazugehörigen Menge an Protein“ und lässt eine Aussage über die katalytische Effizienz des Proteins zu. Die spezifische Aktivität des Wildtyp-FVIII-Proteins beim Menschen beträgt rechnerisch 6,7 U/μg. Die spezifische Aktivität des von uns exprimierten rFVIII/Wt Proteins im Medienüberstand lag bei 8 U/μg, im Zell-Lysat bei 7,2 U/μg und entsprach damit, insbesondere im Zell-Lysat, dem Erwartungswert. Ein Grund hierfür war, dass die bestimmten Werte im Zell-Lysat in einem besser messbaren Rahmen lagen als bei den Messungen im Medienüberstand.

Rekombinanter FVIII/Wt, von CHO-Zellen produziert, wurde in der Vergangenheit mehrfach sehr genau charakterisiert und mit dem aus Plasma isoliertem FVIII-Protein verglichen. Dabei konnten keine Unterschiede in der Struktur der beiden Proteine festgestellt werden. Die spezifische Aktivität des rekombinanten Proteins lag vielfach höher als die des gereinigten Plasma-FVIII (Kaufman, 1992b). Verantwortlich hierfür war die geringere Reinheit und Konzentration der aus dem Plasma hergestellten Proteine.

Ebenso wurden für die Proteinvarianten Aktivität, Antigen und sich die daraus resultierende spezifische Aktivität bestimmt und mit dem FVIII/Wt verglichen. Anhand der funktionellen Eigenschaften wurden diese in 4 Gruppen eingeteilt.

Die Protein-Varianten der *Gruppe 1* (Arg1310Gly: CpG-Dinukleotid und Val993Leu: schwere Verlaufsform der Hämophilie) unterschieden sich in den FVIII:C- und FVIII:Ag-Werten nicht wesentlich vom Wildtyp (s. Abb. 19 und 20); sie waren sowohl

in ihrer Funktion sowie auch in der Sekretion nicht eingeschränkt und somit in ihren funktionellen Eigenschaften mit dem Wildtyp vergleichbar. Die Missense-Mutationen hatten bei den Proteinen dieser Gruppe keinen messbaren Einfluss auf das Protein.

Bei *Gruppe 2* (Glu1038Lys: mittelschwere Verlaufsform, Asn1441Lys: keine Angaben, Glu1579Asp: schwere Verlaufsform und Ala1591Ser: keine Angaben) war festzustellen, dass FVIII:C und FVIII:Ag im Medium um die Hälfte reduziert waren, die Werte im Zell-Lysat aber in der Größenordnung vom Wildtyp lagen (s. Abb 19 und 20). Bei den Proteinvarianten dieser Gruppe war also das Sekretionsverhalten eingeschränkt (Abb. 22). Ein möglicher Einfluss der Mutationen in der B-Domäne des FVIII-Proteins während des Protein-Traffickings ist im nächsten Kapitel aufgeführt. Die sich aus der Aktivität und dem Antigengehalt berechnete spezifische Aktivität zeigte im Falle Glu1038Lys und Asn1441Lys eine starke Abweichung für das im Zell-Lysat und das im Medienüberstand getestete Protein. Bei diesen Proteinen war die spezifische Aktivität bei dem im Zell-Lysat bestimmten Protein höher und damit näher am Wildtyp (Abb. 21). In beiden Fällen wurde weniger aktives FVIII:C und FVIII:Ag im Zellkulturüberstand nachgewiesen, allerdings war im Verhältnis die Reduktion der Aktivität größer als die des Antigengehaltes (s. Abb. 19 und 20). Es liegt die Vermutung nah, dass es sich bei einem Teil des FVIII-Proteins um inaktives Protein handelte und somit die Unterschiede in der spezifischen Aktivität zustande kommen, da diese aus dem Quotienten FVIII:C/FVIII:Ag bestimmt wird.

Ebenfalls nur die Hälfte der Aktivitäts- und Antigen-Werte wurden im Zell-Lysat bei den Proteinen aus *Gruppe 3* (Pro928Arg und Asp1241Glu) detektiert. Im Medienüberstand dagegen war die FVIII:C mit dem Wildtyp vergleichbar, da es hier zu einer Reduktion des FVIII:Ag kam (Abb. 19 und 20). Die spezifische Aktivität der Proteinvarianten Glu1038Lys im Medienüberstand war nur noch halb so groß, bei der Proteinvarianten Pro928Arg doppelt so groß im Vergleich zum Wildtyp.

In unseren Experimenten wurde bei allen detektierten Proteinen FVIII-Aktivität nachgewiesen. Bei den Proteinen der Gruppen 1 bis 3 ist ausreichend Restaktivität im Zellkulturüberstand nachgewiesen worden, d.h., es ist aktives Protein in ausreichender Menge sezerniert worden. Trotz einiger Abweichungen in FVIII:C und FVIII:Ag rechtfertigen diese Mutationen daher nicht den in den betroffenen Patienten

nachgewiesenen mittelschweren bis schweren hämophilen Phänotypen, da in allen Fällen mindestens 50% des aktiven Proteins nachgewiesen wurden.

Nur bei der Proteinvarianten Leu1462Pro (*Gruppe 4*) scheint der Genotyp tatsächlich für den Phänotyp verantwortlich zu sein, weil hier weder in den Aktivitätstests, noch in den Antigenbestimmungen im Medienüberstand ein Protein nachgewiesen wurde. Im Zell-Lysat dieser Proteinvarianten befand sich dagegen in ausreichender Menge ein aktives Protein. Dieses war in seiner spezifischen Aktivität durch die Mutation nicht beeinträchtigt und war vergleichbar mit der des Wildtyps. In diesem Fall scheint die Sekretion des Proteins durch die Mutation unterbunden worden zu sein.

4.3.2 Sekretionsverhalten

Alle rekombinanten Proteine, mit Ausnahme von Pro1462Leu, wurden in unseren Versuchen gut sezerniert. Das weist daraufhin, dass es bei den betroffenen Patienten einen anderen Defekt an anderer Stelle des Proteins oder in einem anderen Protein geben muss, der bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht diagnostiziert worden ist. Zwar unterschieden sich die Proteinvarianten in ihren funktionellen Eigenschaften vom Wildtyp, aber ein Funktionsverlust der Proteinvarianten, der eine Hämophilie A rechtfertigte, war nicht zu beobachten.

Die Proteinvariante Pro1462Leu wurde weder über den Aktivitätstests noch über den Antigen-ELISA im Medienüberstand nachgewiesen. Im Zell-Lysat dagegen war ein aktives Protein, das in seinen funktionellen Eigenschaften dem des Wildtyp-Proteins entsprach, vorhanden. In diesem Fall kam es also zu keiner Sekretion des Proteins aus der Zelle. Während der Sekretion passiert das FVIII-Protein mehrere Stationen und erfährt die verschiedensten Modifikationen:

Transport im Endoplasmatischen Reticulum – Wechselwirkungen mit Chaperonen

Zu Beginn der Sekretion werden Proteine, die sezerniert werden sollen, mit einer N-terminalen Signalsequenz von 13-36 zumeist hydrophoben Aminosäuren an membrangebundenen Ribosomen synthetisiert (Blobel und Dobberstein, 1975). Das Faktor-VIII-Protein besitzt eine Signalsequenz von 19 Aminosäuren. Das entstehende Protein wird anschließend cotranslational durch eine Pore (Sec61-Translokation) in der ER-Membran in das ER-Lumen transloziert (Walter und Johnson, 1994; Rapoport et al., 1996). Da die Größe der Pore für den Transport gefalteter Proteine nicht ausreicht, erreichen diese das ER-Lumen im entfalteten Zustand (Beckmann et al., 1997; Hamman et al., 1997 und Hanein et al., 1996). Für die Reifung des Proteins sind verschiedenen Modifikationen notwendig, u. a. die proteolytische Abspaltung der Signalsequenz, Glykosylierung des Proteins, Ausbildung von Disulfidbrücken, Hydroxylierung von Lysin- und Prolinresten etc. (Helenius, 2001). Daher sind Faltung und die Kontrolle dieser strukturellen Integrität sekretorischer Proteine eine Hauptfunktion des ER. Während der Sekretion des FVIII-Proteins kommt es zu Interaktionen mit verschiedenen Enzymen, unter anderem mit den Chaperonen Calnexin/Calreticulin und BiP im ER (Gething et al., 1997; Kaufman et al., 1997 und Fallaux et al., 1996). Chaperone (englisch für „Anstandsdame“) beinhalten selbst keine Information für die Faltung des FVIII-Proteins, sondern erleichtern durch die transiente Bindung an die neu synthetisierten FVIII-Proteine einen langsamen und korrekten Faltungs- und Assemblierungsprozess.

Das Chaperon BiP gehört zur Familie der 70 kDa Hitzeschock-Proteine (Hsp70). Es macht ungefähr 5% des luminalen Anteils an ER-Proteinen aus. Seine Synthese wird durch die Akkumulation von Proteinvorläufern (Normington et al., 1989) und durch das Vorhandensein mutanter Proteine (Kozutsumi et al., 1988) induziert. Es ist an der Faltung und am Schutz von Proteinen während und nach zellulärem Stress und am intrazellulären Transport beteiligt. Für diese Funktion komplexiert es exponierte hydrophobe Polypeptidsegmente und verhindern dadurch deren unkontrollierte Faltung und Aggregation. Das BiP bindet an eine 110-Aminosäure große Region in der A-Domäne des FVIII-Proteins (Swaroop et al., 1997). Die Substratbindungsstellen von BiP erkennt seine Substrate durch Interaktion mit einer

Sequenz aus 5 aufeinander folgenden Aminosäuren (in komplett ausgestreckter Form) (Wang et al., 1998). Die Wechselwirkung mit dem FVIII-Protein wird dabei durch Zyklen von ATP-Bindung und -Hydrolyse gesteuert (Bukau und Horwich, 1998; Hartl et al., 1996). Der intrazelluläre ATP-Gehalt ist somit limitierend für den FVIII-Protein-Transport aus dem ER (Tagliavacca et al., 2000). Aber nicht nur ein Mangel an ATP sondern auch eine Überexpression von FVIII führt zu einer Speicherung im ER (Morris et al., 1997 und Pittman et al., 1994).

Missense-Mutationen, die zu einer falschen Faltung des FVIII-Proteins führen, werden entweder komplett (schwere Verlaufsform der Hämophilie A) oder nur zu einem Teil (mittlere bis mittelschwere Verlaufsform) in der Zelle zurückgehalten. BiP ist auch an der Erkennung und am Abbau von falsch gefalteten Proteinen beteiligt. Missgefaltete Proteine können im ER akkumulieren und so eine ER-Streß-Antwort („**Unfoldet-Protein-Response**“, UPR) auslösen (Kohno et al., 1993; Kozutsumi et al., 1988). BiP ist in der Lage, diese Proteinkomplexe zu erkennen und dient somit als „Messfühler“ für die UPR (Dorner et al., 1992; Morris et al., 1997; Kostova et al., 2003):

In ungestressten Zellen liegt BiP im Komplex mit PERK (Transmembrankinase) vor. Falsch gefaltete FVIII-Proteine konkurrieren mit PERK um die BiP-Bindungsstelle. Kommt es nun zu einer Anhäufung dieser ungebundenen Proteine durch Blockierung der Bindungsstellen durch missgefaltete Proteine, kann vermehrt ungebundenes PERK oligomerisieren und in seiner jetzt aktiven Form den Initiationsfaktor 2 α (eIF2 α) phosphorylieren. Dieser wiederum behindert die Bildung des 43S Translations-Initiations-Komplexes (Hinnebusch et al., 1994), wodurch die Proteinsynthese vermindert und die Zufuhr weiterer Proteine ins ER gestoppt wird (Harding et al., 1999; Prostko et al., 1992).

BiP selbst kann seiner eigenen Proteinsyntheseinhibition entgehen (Gülow et al., 2002) und wird so selbst zu einem kritischen Parameter. Zu hohe Mengen an BiP führen durch ein Überangebot an Substratbindungsstellen zu einer Verzögerung der UPR. Die Syntheserate der falsch gefalteten Proteine wird somit nicht gestoppt und führt zu einer Anhäufung des FVIII-Proteins in der Zelle. Niedrige Mengen an BiP haben eine permanente Stress-Situation der Zelle zur Folge, weil PERK durch Mangel an BiP-Bindungsstellen auch in Abwesenheit von missgefalteten Protein oligomerisieren und so die Proteinsynthese stoppen kann.

Der UPR folgt der **ER associated degradation** Prozess (ERAD) (Casagrande et al., 2000; Friedländer et al., 2000; Ng et al., 2000; Travers et al., 2000). FVIII-Proteine, die im ER nicht in die korrekte Form gefaltet wurden, werden durch das ERAD eliminiert, indem sie aus dem ER geschleust und zum endgültigen Abbau dem Proteosom zugeführt werden (Klausner und Sitia, 1990; Plemper und Wolf, 1999 und Pipe et al., 1996) (Abb. 24). In vorangegangenen Studien wurde ein hoher Anteil an FVIII-Protein im ER detektiert (Pipe et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde der Anteil an FVIII-Protein im Zell-Lysat bestimmt, allerdings wurde nicht differenziert, in welchem Zell-Kompartiment sich dieser befand.

Calnexin, ein integrales Membranprotein, ist ein Glykoprotein-spezifisches ER Chaperon (Ou et al., 1993), dessen lösliches Analog Calreticulin ist (Peterson et al., 1995). Eine Studie von Becker et al, 2004 hat gezeigt, dass das FVIII-Protein mit dem Calnexin im ER colokalisiert ist. Durch Calnexin wird die N-Glykosylierung vermittelt, die eine entscheidende Rolle bei der Qualitätssicherung von Glykoproteinen im ER spielt (Helenius und Aebi, 2001; Parodi et al., 2000), d.h., dass nur Proteine mit der richtigen Oligostruktur vom Calnexin erkannt und gebunden werden. Auffällig ist, dass sich von insgesamt 25 Glukosylierungsstellen 19 in der B-Domäne befinden (Kumar et al., 1996; Kane et al., 1988; Cripe et al., 1992). Initiiert wird die Glykosylierung durch die Anheftung einer Glykangruppe mit 3 Glukoseresten am Stickstoff von Asparaginen im Lumen des ER. Dieses geschieht an Asparaginen, die in einer Aminosäurefolge von Asparagin/X/Serin oder Thyrosin vorliegen. Man hat festgestellt, dass an den Glykosylierungsstellen eine kompaktere Faltung der Polypeptidkette besteht. Die nachfolgende Behandlung durch die Glukosidasen I und II, bei der nacheinander 2 der 3 Glukosereste wieder abgespalten werden und so monoglycosylierte Asparaginreste entstehen, ist für die Bindung des FVIII-Proteins an das Chaperon notwendig (Pipe et al., 1998; Herbert et al., 1997; Vassilakos et al., 1996) (Abb. 24). Ist das Protein richtig gefaltet, wird es, durch Abspaltung des letzten Glukoserestes durch die Glucosidase II, vom Calnexin gelöst (Abb. 24). Falsch gefaltetes Protein kann durch die UDP-Glukose-Glukoprotein-Glukosyltransferase (UGGT) erneut monoglykosyliert werden (Ellgaard und Helenius, 2001; Parodi et al, 2000) und so dem Calnexin wieder zugeführt werden. Ein Glukoprotein (FVIII) kann so mehrfach dem Calnexin zugeführt werden (Ganau et al., 1991). B-Domänen

deletiertes FVIII Protein bindet signifikant schlechter an dieses Chaperon (Pipe et al., 1998). Das bestärkt die Vermutung der Beteiligung der B-Domäne am Proteinfaltungsprozess, was für die Proteinsekretion Voraussetzung ist. Die genaue Bindungsregion der B-Domäne an das Chaperon ist noch unbekannt. Die Proteinvarianten der Gruppe 2 werden nur zur Hälfte (verglichen mit dem Wildtyp) sezerniert. Das weist auf eventuelle Wechselwirkungen der 2. Hälfte der B-Domäne mit dem Calnexin hin, weil diese Missense-Mutationen in dem Teil lokalisiert sind. Das Calnexin/Calretikulin-UGGT-System und BiP dienen dem Proteinfaltungsprozess (zusammengefasst in Ellegaard und Helenius 2001 und Parodi et al., 2000). Möglicherweise kann BiP aber beim Wegfall des Calnexin/Calretikulin-UGGT-System dessen Funktion übernehmen (Molinari und Helenius, 2000) und somit die Funktion der B-Domäne aufheben. Das hätte aber zur Folge, dass nur ein Teil des exprimierten Proteins sezerniert wird. Dieses könnte die Reduktion der Sekretionsrate bei den Proteinen der Gruppe 2 erklären, da es in diesem Fällen zu einer verminderten Sekretion kam.

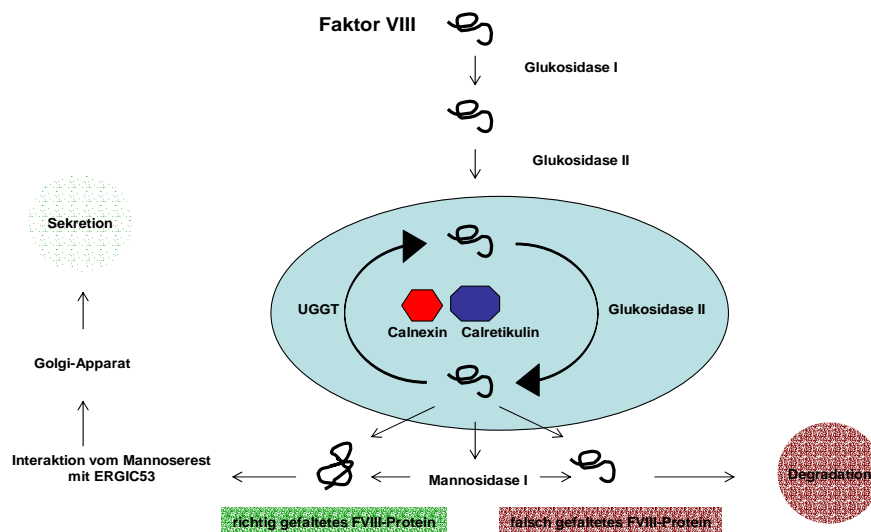


Abb. 24: Weg des FVIII-Proteins durch das ER bis zur Sekretion. N-gebundene Oligosaccharide werden im ER an die Aminosäure Asparagin an neu synthetisierte Glukoproteine angehängt und durch die Glukosidasen I und II abgespalten. Länger zyklierende ungefaltete Proteine werden von der Mannosidase I prozessiert und für den Abbau markiert.

Transportweg zum Golgi-Apparat – ERGIC 53 / MCDF2

Korrekt modifiziertes und gefaltetes FVIII-Protein verlässt das ER in Richtung des Golgi-Apparates in COPII Vesikeln über die ER-exits-sites. Durch Interaktion mit dem ERGIC53 gelangt das FVIII-Protein zum Golgi-Apparat. COPII Vesikel interagieren mit kurzen hydrophoben Sequenzen der zu transportierenden Membranproteine (Fiedler et al., 1996; Kappeler et al., 1997; Hauri et al., 2000). Das **ER-Golgi intermediäre Compartment 53** (ERGIC53) ist ein tubovesikuläres membranumhülltes Intermediat zwischen ER und Golgi. Es dient der Sortierung und Konzentration der zu transportierenden Proteine und der Rückführung von ER-ständigen Proteinen zum Abbau (Hauri et al., 2000). Diese Prozesse sind abhängig von der richtigen Glykosylierung des FVIII-Proteins (Moussalli et al., 1999; Cunningham et al., 2003; Nichols et al., 1998; Zhang et al., 2003).

Durch Missense-Mutationen hervorgerufene Missfaltung des FVIII-Proteins kann einen Transportstop des FVIII-Proteins zur Folge haben. Diese Proteine werden dem Abbauprozess zugeführt. So könnte auch Pro1462Leu für eine falsche Faltung des FVIII-Proteins verantwortlich sein und somit für die Rückführung des Proteins in das ER. Die Proteinvarianten Asn1441Pro könnte ein Einfluss auf die Glykosylierungsstelle an der Aminosäureposition 1442 haben und so den Transport des Proteins in den Golgi-Apparat behindern.

Missense Mutationen in dem ERGIC53-Gen haben einen kombinierten Mangel von FV und von FVIII zur Folge. 2 von 3 Patienten mit einem kombinierten FV/FVIII-Mangel, weisen keine Expression von ERGIC-53 auf (Nichols et al., 1998 und 1999). In diesem Zusammenhang wurde ein weiteres Protein, das „**multiple coagulation factor deficiency gene 2**“ (MCFD2), welches über einen Calcium-Ion mit dem ERGIC-53 interagiert, identifiziert. Missense-Mutationen in der EF-2-Domäne dieses Proteins sind ebenfalls verantwortlich für einen kombinierten FV/FVIII-Mangel (Zhang et al., 2004). Allerdings haben Versuche mit Mutationen an den Glykosylierungsstellen in der B-Domäne gezeigt, dass auch Glykosylierungen außerhalb der B-Domäne und eventuelle Protein-Protein-Interaktionen mit dem ERGIC-53 an der Sekretion beteiligt sind (Cunningham et al., 2003).

Transport innerhalb des Golgi-Apparates

Der Golgi-Apparat, bestehend aus einer Anzahl von membranumhüllter Kompartimente, in Stapeln angeordnet, ist ein zentraler Ort für alle Proteine, die sezerniert und an die Zelloberfläche transportiert werden sollen (Farquhar und Palade, 1998; Warren und Malhotra, 1998). An dieser Stelle des Proteintransportes kommt es zu einer Art Proteinstau. Der Golgi-Apparat scheint eine Art „Nadelöhr“ für die zu sezernierenden Proteine zu sein. Es kommt vor, dass ein großer Anteil des neusynthetisierten Wildtyp Protein das ER nicht verlassen kann und abgebaut wird (Petäjä-Repo et al, 2000 und 2001; Schubert et al., 2000).

Für den Transport des Proteins durch den Golgi-Apparat werden mehrere Modelle diskutiert. Ein Modell stellt Transportvesikel in den Vordergrund. Angenommen wird eine Proteinladung die anterograd in COPI-Vesikel von einer Zisterne zur nächsten transportiert wird (Pelham, 1998). Der retrograde Transport vom Golgi-Apparat/ERGIC zurück zum ER wird ebenfalls mit Hilfe von COPI-Vesikeln geregelt (Kappeler et al., 1997; Letourneur et al., 1994). Die zu transportierenden Proteine interagieren mit Komponenten der COPI Hülle (Lanoix et al., 2001). Becker et al. zeigten im April diesen Jahres, dass rekombinanter Wildtyp FVIII, B-Domänen deletierter FVIII sowie der native FVIII in Kooperation mit COP 1-Transportvesikeln transportiert werden. Somit liegt die Vermutung nah, dass die Anwesenheit der B-Domäne in diesem Schritt der Sekretion keinen Einfluss besitzt (Pittman et al., 1994).

Ein anderes Modell ist das Reifungsmodell. Dabei wird angenommen, dass von den Exits sites (transitional ER) Vesikel abgeschnürt werden, die nach dem Abwerfen ihrer Proteinhülle homotypisch fusionieren und so das ERGIC bilden. Fusionieren mehrere ERGICs entsteht eine neue cis-Zisterne, die durch Reifung alle Golgi-Stufen, bis hin zum Trans-Golgi, durchläuft. Zelleigene Proteine, die für die Modifikation der zu sezernierenden FVIII-Proteine benötigt werden, werden mittels COPI-Vesikeln an ihren Bestimmungsort transportiert, so dass immer ein Anteil von Golgi-Enzymen vorhanden ist, um Protein zu modifizieren (Glick und Malhotra, 1998). Das Reifungsmodell wird durch die Tatsache unterstützt, dass auch Proteine wie das FVIII-Protein durch den Golgi-Apparat befördert werden müssen, die für einen COPI-Vesikeltransport zu groß sind (Stephens et al., 2002; Mironov et al., 1997).

B-Domäne

Das Gerinnungsprotein FV hat die gleiche Proteinstruktur wie das FVIII-Protein (A1-A2-B-A3-C1-C2) und weist eine ~ 40 %ige Homologie zu den A- und C- Domänen vom FVIII auf (Toole et al., 1992; Vehar et al., 1984; Jenny et al., 1987). Bei beiden besteht die B-Domäne nur aus einem großen Exon, das einen hohen Anteil an Glykosylierungen an Asparaginresten vorweist. Allerdings ist zwischen beiden B-Domänen keine Aminosäure-Homologie vorhanden (Hironaka et al., 1992; Kumar et al., 1996; Kane et al., 1988; Cripe et al., 1992). Auch hat im Gegensatz zum FVIII-Protein die B-Domäne beim FV-Protein keinen Einfluss auf das Sekretionsverhalten (Kane et al., 1990). FV ist nicht mit dem BiP assoziiert und für die Sekretion des Proteins wird somit auch kein ATP benötigt (Pittman et al., 1994). Das Expressionslevel des FV ist 10-mal höher als das des FVIII-Proteins, da der Transport vom ER aus der Zelle ins Medium effektiver ist. Wahrscheinlich liegt eine optimalere Faltung des Proteins und Interaktionen mit anderen ER Chaperonen vor.

Funktionelle Bereiche in der B-Domäne des FVIII-Proteins sind nicht bekannt. Allerdings könnte unsere Mutationsanalyse der Proteinvarianten Pro1462Leu auf einen funktionellen Bereich für die Sekretion hinweisen. Möglich wäre auch, dass durch die in vitro Mutagenese bei der Herstellung des rekombinanten Pro1462Leu ein zufälliger Fehler (Basenaustausch und daraus resultierender Aminosäureaustausch) in die FVIII-Sequenz eingebracht wurde. Allerdings ist dieses sehr unwahrscheinlich, da für die PCR die *Pfu*-Polymerase verwendet wurde, die in der Lage ist, Fehlpaarungen zu erkennen und zu reparieren.

Die Funktion der B-Domäne im Blut wird dahingehend gesehen, dass sie – neben dem von-Willebrand-Faktor - aufgrund ihrer herausstehenden Position eine Schutzfunktion für den Rest des Proteins besitzt (Abb. 25) (Mosesson et al., 1990). Dadurch wird das FVIII-Protein anscheinend vor ungerichteter und gerichteter Proteolyse bzw. vor vorzeitiger Aktivierung durch das Thrombin geschützt. So ist eine schnellere (Eaton et al., 1986) und höhere (Meulien et al., 1988) Aktivierbarkeit durch Thrombin für B-Domänen-verkürzte-FVIII-Proteine beschrieben worden.

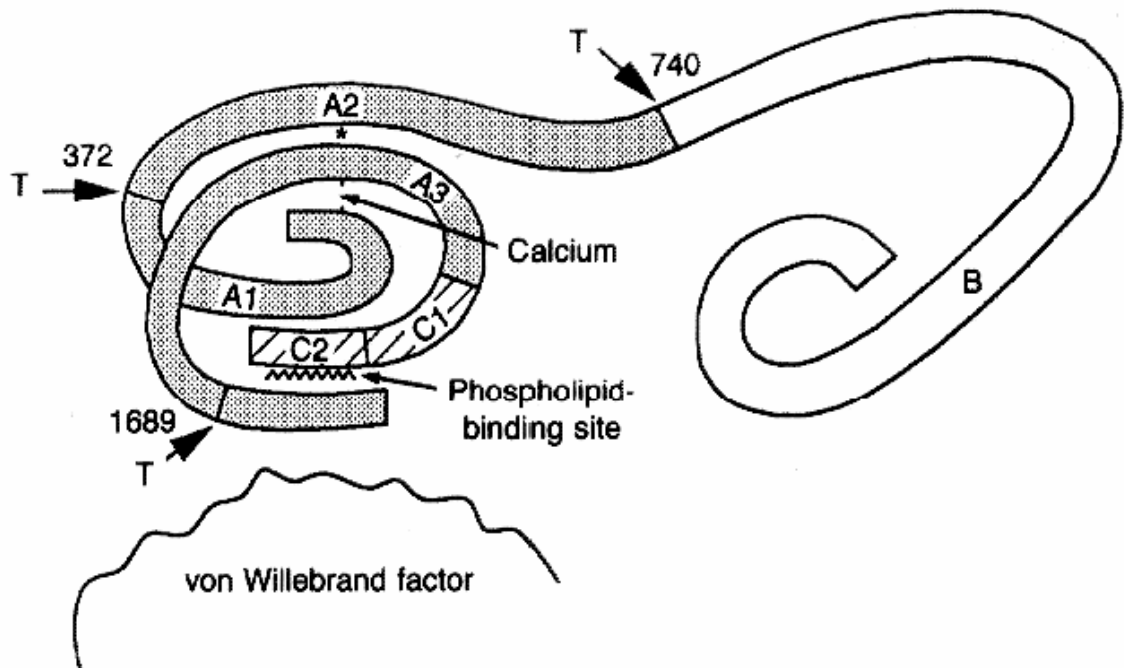


Abb. 25: Schematisches Modell von FVIII vor der Aktivierung durch Thrombin. Die B-Domäne ragt aus dem Protein heraus (Hoyer et al., 1994). Die Thrombinschnittstellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Bemerkenswert ist, dass ein Großteil der Pharmaindustrie noch immer rekombinante Protein-Präparate herstellt, bei denen sie FVIII/Wt-Gene verwenden, obwohl eine Expression mit dem B-Domänen-deletierten-FVIII-Proteins die Ausbeute des Proteins aus Zellkulturen stark erhöhen würde. Ganz offensichtlich vermuten diese Hersteller, dass die B-Domäne für das FVIII-Protein eine kritische funktionelle Bedeutung hat. Die durch die fehlende B-Domäne gesteigerte Produktionsmenge wäre für die Industrie aus ökonomischer Sicht effektiver. Allerdings gibt es auch eine Firma, die B-Domänen-deletierten-FVIII rekombinant für die Behandlung von Hämophilie A Patienten herstellt. Behandlungen mit diesem B-Domänen-deletierten-FVIII-Konzentrat hat allerdings gezeigt, dass es bei den betroffenen Patienten zu unerwarteten Blutungsereignissen kommt (Erfahrungsberichte von Herrn Dr. Brackmann, Hämophilie-Ambulanz Bonn). Dieses spiegelt die Unsicherheit der Industrie wieder, ob auf die B-Domäne verzichtet werden kann, oder ob sie nicht doch eine Bedeutung für das FVIII-Protein besitzt.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass beide Formen des FVIII-Proteins (Wildtyp und B-Domänen deletierter) in verschiedenen Zell-Linien exprimiert werden können (Haack et al., 1999). Verschiedene Gründe sprechen für die Verwendung von CHO-Zellen als Expressionsmodell. Neben der Fähigkeit das Fremd-Gen in ein Chromosom zu integrieren, wodurch eine stabile Expression des rekombinanten Proteins möglich ist, wachsen CHO-Zellen in der Abwesenheit von Serum und liefern eine hohe Ausbeute bei anderen rekombinanten Proteinen (Kaufman et al., 1992). Die Sonderstellung von CHO-Zellen wird dadurch sichtbar, dass die Zell-Linie seit 50 Jahren erfolgreich bei der Expression verschiedener rekombinanter Proteine verwendet wird und, neben BHK-Zellen, immer noch das Expressionsmodell für rekombinante FVIII-Proteine darstellt.

Homologievergleich von B-Domänen verschiedener Spezies

Vergleicht man die B-Domäne des menschlichen FVIII Proteins mit der von Schwein, Hund und Maus, so stellt man fest, dass diese kaum Homologien aufweisen (Abb. 26). Damit ist diese Domäne im Gegensatz zum restlichen Protein wenig konserviert.

		B – Domäne Anfang	
FVIII_pig	RGMTALLKVYSCDRDIGDYDNTYEDIPGFLLSGKNVIEPRSFQAQNSRPPSASQKQFQTI	778	
FVIII_Canin	RGMTALLKVSSCNRNIDDYEDTYEDIPTLLNENNVIKPRSFQNSRHPSTKEKQLKAT	772	
FVIII_Hum	RGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNAT	778	
FVIII_mouse	RGMTALLKVSSCDKSTSDYDEIYEDIPTQLVNENNVIDPRSFQNTNHPNTRKKKFKDS	778	
	***** **:: . ***: ****. *: . :*.*** **:: . *: ::::		
FVIII_pig	TSPEDDVE-LDPQSGERTQALEELSVPSGDGSMMLGQ-NPAPHGSSSSDLQEARNE--AD	834	
FVIII_Canin	TTPENDIEKIDLQSGERTQLIKAQSVSSDLLMLLGQ-NPTPRGLFLSDLREATDR--AD	829	
FVIII_Hum	TIPENDIEKTDWPFAHRTMPKIQNVSSDLLMLLRQ-SPTPHGLSLSDLQEAKEYETFSD	837	
FVIII_mouse	TIPKNDMEKIEPQFEEIAEMLKVQSVSVSDMLMLLGQSHPTPHGLFLSDGQEAIEAHD	838	
	* **:::* : . : : *. . * * * * * *: * * * * : * * . *		
FVIII_pig	DYLPGARERNTAPSAAARLRPELHLSAERVLTPEPEK-----ELKKLDSKM	880	
FVIII_Canin	DHSRGAIERNKGPPEVASLRPELRHSEDREFTPEPELQLRLNENLGTNTTVELKKLDLKI	889	
FVIII_Hum	DPSPGAIDSNNLSSEMTHFRPQLHHSQDMVFTPESEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKV	897	
FVIII_mouse	DHSPNAIDSNEGPSKVTQLRPESHSEKIVFTPPQGLQLRSNKSLETTIEVKWKKLGLQV	898	
	* . * : * . . : **:: ** . : **:: . : ***. ::		
FVIII_pig	SSSDLLKTSPTIPSDTLAETERTHSLGPPHPQVNFSQLGAIVLGKNSSHFIGAGVPL	940	
FVIII_Canin	SSSDSLMTSPTIPSDKLAAATEKTGSLGPPNMSVHFNGHLGTIVFGNNSHLIQSGVPL	949	
FVIII_Hum	SSTSNNLIS--TIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDITLFGKKSSPLTESGGPL	955	
FVIII_mouse	SSLPSNLMIT-TILSDNLKATFEKTDSSGFDPMPVHSSSKLSTTAFGKKAYSLVGSHVPL	957	
	** .. * : ** **.* * :.* * * * *: . :. : : : : : : : *		
		Pro928Arg: 0	
		Val993Leu: 3	
FVIII_pig	GSTEED-----HESSLGENVSPVESDGI FEKERAHGPASLT KD DVLKVNIS	987	
FVIII_Canin	ELSEEDNDSKLLEAPLMNIQESSLRENVLSMESNRLFKEERIRGPASLIKDNALFKVNIS	1009	
FVIII_Hum	SLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVNIS	1015	
FVIII_mouse	NASEENSDSNILDSTLMYSQESLPRDNILSIENDRLREKRFHGIALLT KDNTLFKDNVS	1017	
	::*:: : ** .*: . *.. :.: : * : * * * *: . *** . : *		

		Gly1038Lys: 3	
FVIII_pig	LVKTNKARVYLKTNRKIHIDDAALLTENRAS-----ATFMDKN	1025	
FVIII_Canin	SVKTNRAPVNLTTNRKTRVAIPTLLIENSTSVWQDIMLERNTEFKEVTSLIHNETFMDRN	1069	
FVIII_Hum	LLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQN-ILESDETFKKVTPLIHDRMLMDKN	1134	
FVIII_mouse	LMKTNKTYNHSTTNEKLHTESP-TSIENSTTDLQDAILKVNSETQEVTALIHDTLLGKN	1076	
	:***:: **.* : . ** .:		:::.*
FVIII_pig	TTASGLNHVSN-----WIKGPLGK	1044	
FVIII_Canin	TTALGLNHVSNKTTLSKNVEMAHQKKEDPVPLRAENPDLSSSKIPFLPD---WIK-THGK	1125	
FVIII_Hum	ATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSEFFKMLFLPESARWIQRTGK	1134	
FVIII_mouse	STYLRLNHMLNRTTSTKNKDIFHRKDEDPIDQDEENTIMPFKMLFLSESSNWFKKTNGN	1136	
	:* ***: *		*:: . *:
FVIII_pig	NPLSSERGSPPELLTSSGSGKSVKGQSSGQGRIRVAVEEEEELSKGKE---MMLPNSSELT	1101	
FVIII_Canin	NSLSSEQRPSPKQLTSLGSEKSVKDQN-FLSEEKVVVGEDEFTKDTTEL-QEIFPNKSIF	1183	
FVIII_Hum	NSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVGEQNFLEKKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLF	1194	
FVIII_mouse	NSLNSQEHSFKQLVLYLMPFKYVKNQSFLSEKNKVTVEQDGFTKNIGLKDMAFPNMSIF	1196	
	..* : **.* * **.* . :*. * : :*. : * . *		
FVIII_pig	LTNSADVQGNTHSQGKKSREEMERREKLVEKVDLPQVYTATGTKNFLRNIFHQSTEPS	1161	
FVIII_Canin	FANLANVQENDTYNQEKKSLLEEIERKEKLTQENVALPQAHTMIGTKNFKNLFLSTKQN	1243	
FVIII_Hum	LTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNFLFLSTRQN	1254	
FVIII_mouse	LTTLNVHENGHRHNEKNIQEEIEK-EALIEEKVVLPQVHEATGSKNFLKDILILGTRQN	1255	
	::. ::. *. :.* ** :***: * * :*: * * : :***: : :. .		
	Asp1241Glu: 0		
FVIII_pig	VEGFLGGSHAPVPQDSRSLNDSAERAETHIAHFSARE--EAPLEAPGNRT-----	1210	
FVIII_Canin	VAGLEEQPYTPILQDTRSLNDSPHSEGIHMANFSKIRE--EANLEGLGNQTNQMVERFPS	1301	
FVIII_Hum	VEGSDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGE--EENLEGLGNQTKQIVEKYAC	1312	
FVIII_mouse	IS--LYEVHVPVLQNITSINNSTNTVQIHMEHFFKRRKDKETNSEGLVNKTREMVKN---	1310	
	: .*: * : **.* * : * : * * . * : *		
	Arg1310Gly: 4		
FVIII_pig	-----GPGPR-SAVPRFVKQSLKQIRLP---LEEIKPERGVVLNATSTRWS-----	1252	
FVIII_Canin	TTRMSSNASQ-HVITQRGKRSKQPRLS---QGEIKFERKVIANDTSTQWSKNMNYLAQG	1357	
FVIII_Hum	TTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLP---LEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPS	1369	
FVIII_mouse	-----YPSQKNITTQRSKRALGQFRLSTQWLKTINCSTQCIKQIDHSKEMK-----	1357	
	.: .: * **.* * ** .: . : . . .		
FVIII_pig	-----		
FVIII_Canin	TLTQIEYNEKEKRAITQSPSLDCSMRNHVITQMNDALPVAKESASPSVRHTDLTKIPSQ	1417	
FVIII_Hum	TLTQIDYNEKEKGAITQSPSLDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQ	1429	
FVIII_mouse	-----KFITKSSLSLSD-SSVIKSTTQTNSSDSHIVKTSAFP--PIDLKRSPFQ	1401	
		Asn1441Lys: 4	Leu1462Pro: 3
FVIII_pig	-----ESSPILQGAQRNLSLPLFTLEMAGGQKISALGKSA	1289	
FVIII_Canin	HNSSHLPASACNYTFRERTSGVQEGSHFLQEAQRNLSLAFVTLGITEGQGFSSLGKSA	1477	
FVIII_Hum	DNSSHLPAA-----YRKKDSGVQESSHFLQGAQRNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSA	1485	
FVIII_mouse	NKFSHVQASSYIYDFKTKSSRIQESNNFLKETKINNPSLAILPWNMFIDQGKFTSPGKSN	1461	
	.. :: :* ** **..: . : * : . : *		
FVIII_pig	AGPLASGKLEKAVLSSAGLSEASGAEFPLPKVRVHREDLLPQKTSNVSCAHGDLGQEIFL	1349	
FVIII_Canin	TNQPMYKKLENTVLLQPLGSETSDKVELLSQVHVDQEDSFPTKTSNDSPGHLDLMGKIFL	1537	
FVIII_Hum	TNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSKGVELLPKVHIYQKDLFPTETSNNGSPGHLDLVEGSLL	1545	
FVIII_mouse	TNSVTYKKRENIIFLKPTLPEESGKIELLPQVSIQEEIILPTETSHGSPGHNLNLMKEVFL	1521	
	:. * * : :. . * : *.* **.* : : : : * * : *		
		Glu1579Asp: 3	
FVIII_pig	QKTRGPVNLNKNVRPG-----RTPSKLLG-----PPMP-KEWESLEKS	1386	
FVIII_Canin	QKTQGPVKMNKTNSPGKVPFLKWATESSEKIPSKLLGVLAWDNHYDTQIPSEWKSQKKS	1597	
FVIII_Hum	QGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEWKSQKKS	1605	
FVIII_mouse	QKIQGPWKWKAKRHG--ESIKGKTESSKNTRSKLLNHHAWDYHYAAQIPKDWKSKEKS	1579	
	* .*. : *:: * . ****. . : * . * : *		
	Ala1591Ser: 3		
FVIII_pig	PKSTALRTKDIISLPLDRHESNHSIAAKNEGQAETQREAAWTKQGGPGRLCAPKPPVLR	1446	
FVIII_Canin	QNTAFKRKDTI-LPLGPCENNDSTAANEGQDKPQREAMWAKQGEPRCLSQNPPVSKH	1656	
FVIII_Hum	PEKTAFFKKKDTI-LSLNACESNHAIAANEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLR	1664	
FVIII_mouse	PEIISIKQEDTI-LSLRPHGNSHSIGA-NEKQNWQRETWVKQGTQRTCSQIPPVLR	1637	
	::: : * * *. * . : . * * * . : * . * . * . * : * * : * * : *		

FVIII_pig	HQRDISLPTFQPEEDKMDYDDIFSTETKGEDFDIYGEDENQDPRSFQKRTRHYFIAAVEQ	1506
FVIII_Canin	HQREITVTTLQPEEDKFEYDDTFSIEMKREDFDIYGDYEDQGLRSFQKKTRHYFIAAVER	1716
FVIII_Hum	HQREITRRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEDQSPRSFQKKTRHYFIAAVER	1724
FVIII_mouse	HQRELS--AFQSEQEATDYDDAITIET-IEDFDIYSEDIKQGPSFQKKTRHYFIAAVER	1694
	::: ::*::: : :: * *****: .*. *****:*****::	

B-Domäne Ende

Abb. 26: Aminosäuresequenzvergleich der FVIII-B-Domänen verschiedener Spezies. Die einzelnen Gruppen der Mutationen sind farbig gekennzeichnet: Gruppe 1 in blau, Gruppe 2 in grün, Gruppe 3 in orange und Gruppe 4 in rot. Es sind nur die B-Domänen von FVIII Schwein, Hund, Mensch und Maus miteinander verglichen worden. *: hoch konserviert (4 Übereinstimmungen), :: konserviert (3 Übereinstimmungen), ::, semi konserviert (2 Übereinstimmungen), (): nicht konserviert (keine Übereinstimmung).

Die B-Domänen der verschiedenen Spezies sind sehr unterschiedlich. Trotz der nicht vorhandenen Homologie kommt es bei den von uns untersuchten Aminosäurepositionen, an denen Missense-Mutationen stattgefunden haben, zu einer hohen Rate von Übereinstimmungen.

Bei dem Beispiel des CpG-Dinukleotids an der Aminosäureposition 1310 sowie bei der Missense-Mutation an der Position 1441 sind die Aminosäuren höchst konserviert. Eine Veränderung an der Position 1310 führt in diesem Fall aber nicht zu einer Einschränkung der funktionellen Eigenschaften sowie des Sekretionsverhalten dieses Proteins. Ebenfalls war bei der Mutation Asn1441Lys die Aktivität des Proteins an sich nicht beeinflusst, allerdings kam es zu einer Reduktion des Sekretionsverhaltens um 27%.

Bei 5 der 9 Aminosäurepositionen (993, 1038, 1462, 1579 und 1591) kam es zu 3 Übereinstimmungen bei den verschiedenen Spezies. Auch in diesen Fällen sind die Positionen ziemlich konserviert. Die Missense-Mutationen an diesen Aminosäurepositionen sind bei den betroffenen Patienten mit einer mittelschweren bis schweren Hämophilie A assoziiert. Die Ergebnisse aus den FVIII-Aktivitätstests der von uns rekombinant hergestellten FVIII-Proteine erklären diesen hämophilen Phänotyp nicht.

Die einzige Ausnahme stellt die Missense-Mutation an der Position 1462 dar. Auch in diesem Fall kam es zu 3 Übereinstimmungen im Vergleich mit den anderen Spezies.

Da kein Protein in dem Zellkulturüberstand nachgewiesen wurde, scheint diese Mutation einen Einfluss auf das Sekretionsverhalten des FVIII-Proteins zu haben.

In Gruppe 3, den Polymorphismen, fand sich die erwartete Variabilität. Bei den Aminosäurepositionen 928 und 1241 gab es keine Übereinstimmungen mit anderen Spezies. Bei diesen Proteinvarianten lag eine deutlich Erhöhung der spezifischen Aktivität, im Vergleich mit dem Wildtyp, vor. Das Antigenlevel und die Aktivität waren aber generell geringer. Der FVIII-Ag-Gehalt war sogar im Verhältnis zur FVIII:C wesentlich geringer. Es scheint, als wird das niedrige Expressionsniveau der FVIII-Proteine durch eine bessere spezifische Aktivität ausgeglichen.

Diese Arbeit zeigt, dass die B-Domäne beim Menschen für die Aktivität des Proteins keine Rolle spielt, Aussagen über die Bedeutung der B-Domäne im Tiermodell kann man aufgrund der fehlenden speziesspezifischen FVIII-Testsysteme nicht treffen. Durch die Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der artspezifischen FVIII-Proteine muss man davon ausgehen, dass sich die jeweiligen FVIII-Proteine in den vorhandenen Testsystemen anders verhalten als der humane FVIII.

Zu Beginn der Arbeit stellte sich uns die Frage der Kausalität der Missense-Mutationen. Nach den vorliegenden Ergebnissen (FVIII:C, FVIII:Ag, spez. Aktivität und Sekretionsverhalten) kann man die Aussage treffen, dass die Punktmutationen in 8 von 9 Fällen nicht für den bei dem betroffenen Patienten gefundenen Phänotyp verantwortlich sind. Aufgrund der Ergebnisse haben dennoch ein Teil der untersuchten Missense-Mutationen wahrscheinlich einen modulierenden Effekt auf die Proteinaktivität, Expression und Sekretion.

Eine nähere Bedeutung der B-Domäne für das Sekretionsverhalten und die damit verbundene „Qualitätskontrolle“ lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht abschließend beantworten. B-Domänen-deletiertes-FVIII-Protein wird zwar bis zu 17fach besser sezerniert als der FVIII Wildtyp, allerdings befindet sich auch prozentual mehr B-Domänen-deletiertes-FVIII-Protein im Zell-Lysat (Pipe et al., 1997). Trotz höherer Expression von B-Domänen-deletierten-FVIII-Protein wird das Protein schlechter sezerniert und das Translationsprodukt nicht so gut durch Proteosomen zersetzt. Dies deutet auf eine Beteiligung der B-Domäne in Wechselwirkungen mit Chaperonen an Abbauprozessen und „Qualitätskontrolle“ hin. Die höhere Expression

der FVIII-B-Domäne-deletierte-Proteinvarianten könnte auch auf eine repressorische-regulatorische Funktion der B-Domäne hinweisen. Ein weiterer Grund der geringen Sekretionsrate des FVIII-Proteins könnte die Größe des FVIII-Wildtyp-Proteins sein. Mit einer Größe von 2332 Aminosäuren (B-Domäne 972 Aminosäuren) ist es möglich, dass der Transport des Proteins die Zellökonomie negativ beeinflusst.

Es ist uns im Verlauf der Arbeit gelungen, ein stabiles und gutes Expressionsmodell zu entwickeln und zu etablieren. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit kann diese Methode bei der Untersuchung weiterer Gerinnungsfaktoren, die in der Arbeitsgruppe bearbeitet werden, Anwendung finden.

4.4 Perspektiven

Die biochemischen Eigenschaften und molekularen Grundlagen des FVIII Proteins konnten seit der Entdeckung des Gens/Proteins 1984 (Gitschier et al., 1984) zunehmend erforscht werden. Molekulare Modelle des FVIII-Moleküls erlauben, gezielt Auswirkungen von Mutationen zu untersuchen und so neue Struktur/Funktionsbeziehungen zu erkennen. In Kombination mit einem effektiven Expressionssystem für den FVIII-Wildtyp ist es möglich, das Trafficking des Proteins näher zu untersuchen und somit die Bedeutung der B-Domäne weiter aufzuklären. Die Entwicklung des FVIII-Wildtyp-Expressionsvektors gibt die Möglichkeit, gezielt Mutationen in der FVIII-B-Domäne zu untersuchen und ermöglicht somit die Entdeckung eventueller funktioneller Bereiche, die bei Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eine Rolle spielen und bei der Sekretion sowie der Faltung des Proteins beteiligt sind. Die Aminosäureposition 1462 ist der erste Bereich inmitten der B-Domäne, bei dem in dieser Weise gezeigt werden konnte, dass ein Leu1462Pro-Austausch offensichtlich für eine verminderte Sekretion des FVIII-Proteins verantwortlich ist.

Die Behandlung mit rekombinanten oder natürlichen, aus Blutplasma gewonnenen, FVIII-Konzentraten verhindert bzw. vermindert die Blutungsneigungen bei den betroffenen Patienten, so dass die Lebensqualität gesteigert werden kann. Gentechnisch hergestellte Präparate sind seit Ende der 80-iger Jahre auf dem Markt.

Eines dieser Präparate wird rekombinant über einen B-Domänen-deletierten-FVIII-Vektor hergestellt. Bei den mit diesem Präparat behandelten Patienten kommt es vermehrt zu spontanen Blutungen (Information von Dr. Brackmann, Hämophilie-Ambulanz, Bonn). Die nähere Untersuchung der FVIII-B-Domäne in dieser Arbeit trägt zum besseren Verständnis der Bedeutung der Domäne für das Gerinnungsprotein bei und kann somit bei der Entwicklung neuer rekombinanter Gerinnungspräparate mit veränderten Eigenschaften (z.B. höherer Wirkungsgrad, verlängerte Halbwertszeit, geringere Immunogenität) beitragen.

Ein weiteres Problem bei der Herstellung von rekombinanten Wildtyp-FVIII Proteinen stellt das geringe Expressionsniveau dar. Da das Produktionsverfahren für rekombinante FVIII-Präparate aufwendig und teuer ist, ist der Bedarf an der Erforschung neuer Vektoren zur effektiven FVIII-Expression und Sekretion vorhanden. Durch ein Expressionssystem, das ausreichend Faktor VIII exprimiert, würde ein attraktives und ökonomisches System für die Industrie geschaffen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Torsten Tonn wurde ein Projekt zur Modifizierung der Kozaksequenz (optimales Translations-Initiierungssignal) von vorhandenen Expressionsvektoren begonnen, in der Hoffnung, das Expressionsniveau des rekombinanten Proteins zu erhöhen (Yonemura H et al., 1993). Vorversuche zeigten schon ein höheres Expressionsniveau von FVIII in verschiedenen Zell-Linien.

Bis zum heutigen Tag ist es trotz vieler Anstrengungen nicht gelungen, eine geeignete Gentherapie für die Hämophilie A zu entwickeln. Gegenwärtig haben adeno-assoziierte Viren das größte Potential, als Vektor für eine erfolgreiche Gentherapie, eingesetzt zu werden. Alle bisherigen Vektoren beinhalten aus verständlichen technischen Gründen B-Domänen-deltierten FVIII. Was ist aber, wenn die B-Domäne doch eine kritische Funktion hat? Das Verständnis der genauen Funktionsweise des FVIII-Proteins, insbesondere die Bedeutung der B-Domäne für die Sekretion, könnte zur Entwicklung neuer effektiver Vektoren beitragen. Es wurden in den letzten 10 Jahren zwar Fortschritte bei der gentherapeutischen Expression von FVIII erzielt, allerdings sind die bisherigen Gentherapie-Ansätze am Menschen aufgrund der geringen FVIII-Expressionsrate noch wenig erfolgreich und bis aufs Weitere eingestellt worden. Somit wird eine effiziente Gentherapie für Erwachsene noch mindestens 10 Jahre auf sich warten lassen. Aus diesem Grund

wird die Substitutionstherapie mit FVIII-Präparaten zunächst die Therapie der Wahl bleiben.

Ein weiterer Aspekt unserer zukünftigen Arbeiten wird die Interpretation der Polymorphismen innerhalb der FVIII-cDNA sein, da deren Beitrag zur Aktivität des FVIII-Proteins noch vollständig unbekannt ist. In unserer Arbeitsgruppe wurden zu diesem Thema SNP-Karten angefertigt, um die Verteilung dieser in der Bevölkerung zu untersuchen. Durch die in dieser Arbeit dargestellte Methode ist es nun möglich, die Polymorphismen in dem FVIII-Wildtyp Protein rekombinant herzustellen und ihre Bedeutung näher zu untersuchen.

In unserer Arbeitsgruppe werde neben dem Faktor VIII-Protein noch weitere Gerinnungsproteine (FII, FX, FV, FXIII) untersucht. Durch die Erfahrungen bei der Entwicklung des FVIII-Expressionsvektors ist es möglich, das System auf die anderen Gerinnungsproteine zu übertragen und Mutationen funktionell zu charakterisieren.

5. Literaturverzeichnis

Ackermann J.W.N., Bourma B.N. and Sisima J.: Boehringer Ingelheim

Antonarakis S.E. (1995) Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and hemophilia A: *Thromb Haemost.*; 74(1):322-8.

Antonarakis S.E., Kazazian H.H., Gitschier J., Hutter P., de Moerloose P., Morris M.A. (1995) Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A: *Adv Exp Med Biol.*; 386:19-34.

Antonarakis S.E., Kazazian H.H., Tuddenham E.G. (1995) Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A: *Hum Mutat.*; 5(1):1-22.

Antonarakis S.E., Rossiter J.P., Young M., Horst J., de Moerloose P., Sommer S.S., Ketterling R.P., Kazazian H.H. Jr., Negrier C., Vinciguerra C. (1995) Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: Results of an international consortium study: *Blood*; 86(6):2206-12.

Bajaj S.P., Schmidt A.E., Mathur A., Padmanabhan K., Zhong D., Matri M., Fay P.J. (2001) Factor IXa:factor VIIIa interaction. Helix 330-338 of factor IXa interacts with residues 558-565 and spatially adjacent regions of the $\alpha 2$ subunit of factor VIIIa: *J Biol Chem.*; 276(19):16302-9.

Banerjee D.K., Tavaréz J.J., Oliveira C.M. (1992) Expression of blood clotting factor VIII:C gene in capillary endothelial cells: *FEBS Lett.*; 306(1):33-7.

Barthels M., Poliwoda H. (1997) *Gerinnungsanalysen*: 5. Auflage, Thieme

Becker S., Simpson J.C., Pepperkok R., Heinz S., Herder C., Grez M., Seifried E., Tonn T. (2004) Confocal microscopy analysis of native, full length and B-domain deleted coagulation factor VIII trafficking in mammalian cells: *Thromb Haemost.*; 92(1):23-35.

Beckmann R., Bubeck D., Grassucci R., Penczek P., Verschoor A., Blobel G., Frank J. (1997) Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex: Science; 278(5346):2123-6.

Bihoreau N., Paolantonacci P., Bardelle C., Fontaine-Aupart M.P., Krishnan S., Yon J., Romet-Lemonne J.L. (1991) Structural and functional characterization of Factor VIII-delta II, a new recombinant Factor VIII lacking most of the B-domain: Biochem J.; 277 (Pt 1):23-31.

Blobel G., Dobberstein B. (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma: J Cell Biol.; 67(3):835-51.

Blobel G., Dobberstein B. (1975) Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components: J Cell Biol.; 67(3):852-62.

Bukau B., Horwich A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines: Cell; 92(3):351-66.

Burke R.L., Pachl C., Quiroga M., Rosenberg S., Haigwood N., Nordfang O., Ezban M. (1986) The functional domains of coagulation factor VIII:C: J Biol Chem.; 261(27):12574-8.

Casagrande R., Stern P., Diehn M., Shamu C., Osario M., Zuniga M., Brown P.O., Ploegh H. (2000) Degradation of proteins from the ER of *S. cerevisiae* requires an intact unfolded protein response pathway: Mol Cell.; (4):729-35.

Chan V., Pang A., Chan T.P., Chan V.W., Chan T.K. (1996) Molecular characterization of haemophilia A in southern Chinese: Br J Haematol.; 93(2):451-6.

Chelly J., Concordet J.P., Kaplan J.C., Kahn A (1989) Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type: Proc Natl Acad Sci U S A., 86(8):2617-21.

Colbere-Garapin F., Horodniceanu F., Kourilsky P., Garapin A.C. (1981) A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells: J Mol Biol.; 25;150(1):1-14.

Colbere-Garapin F., Horodniceanu F., Kourilsky P., Garapin A.C. (1981) Construction of a dominant selective marker useful for gene transfer studies in animal cells: Dev Biol Stand.; 50:323-6.

Cooper D.N., Krawczak M. (1990) The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions: Hum Genet.; 85(1):55-74.

Cooper D.N., Youssoufian H. (1988) The CpG dinucleotide and human genetic disease: Hum Genet.; 78(2):151-5.

Cripe L.D., Moore K.D., Kane W.H. (1992) Structure of the gene for human coagulation factor V: Biochemistry; 31(15):3777-85.

Cunningham M.A., Pipe S.W., Zhang B., Hauri H.P., Ginsburg D., Kaufman R.J. (2003) LMAN1 is a molecular chaperone for the secretion of coagulation factor VIII: J Thromb Haemost.; 1(11):2360-7.

Donath M.J., de Laaf R.T., Biessels P.T., Lenting P.J., van de Loo J.W., van Mourik J.A., Voorberg J., Mertens K. (1995) Characterization of des-(741-1668)-factor VIII, a single-chain factor VIII variant with a fusion site susceptible to proteolysis by thrombin and factor Xa: Biochem J.; 15;312 (Pt 1):49-55.

Donath M.S., Lenting P.J., van Mourik J.A., Mertens K. (1995) The role of cleavage of the light chain at positions Arg1689 or Arg1721 in subunit interaction and activation of human blood coagulation factor VIII: J Biol Chem.; 270(8):3648-55.

Dorner A.J., Bole D.G., Kaufman R.J. (1987) The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins: J Cell Biol., 105(6 Pt 1):2665-74.

Dorner A.J., Wasley L.C., Kaufman R.J. (1990) Protein dissociation from GRP78 and secretion are blocked by depletion of cellular ATP levels: *Proc Natl Acad Sci U S A*; 87(19):7429-32.

Dorner A.J., Wasley L.C., Kaufman R.J. (1992) Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells: *EMBO J*; 11(4):1563-71.

Duncan B.K., Miller J.H. (1980) Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA: *Nature*; 287(5782):560-1.

Eaton D., Rodriguez H., Vehar G.A. (1986) Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity: *Biochemistry*; 28;25(2):505-12.

Eaton D.L., Hass P.E., Riddle L., Mather J., Wiebe M., Gregory T., Vehar G.A. (1987) Characterization of recombinant human factor VIII: *J Biol Chem*; 262(7):3285-90.

Eaton D.L., Wood W.I., Eaton D., Hass P.E., Hollingshead P., Wion K., Mather J., Lawn R.M., Vehar G.A., Gorman C. (1986) Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule: *Biochemistry*; 25(26):8343-7.

Elder B., Lakich D., Gitschier J. (1993) Sequence of the murine factor VIII cDNA: *Genomics*; 16(2):374-9.

Ellgaard L., Helenius A. (2001) ER quality control: towards an understanding at the molecular level: *Curr Opin Cell Biol*; 13(4):431-7.

Fallaux F.J., Hoeben R.C., Cramer S.J., van den Wollenberg D.J., Briet E., van Ormondt H., van Der Eb A.J. (1996) The human clotting factor VIII cDNA contains an autonomously replicating sequence consensus- and matrix attachment region-like sequence that binds a nuclear factor, represses heterologous gene expression, and mediates the transcriptional effects of sodium butyrate: *Mol Cell Biol.*; 16(8):4264-72.

Farquhar M.G., Palade G.E. (1998) The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy: *Trends Cell Biol.*; 8(1):2-10.

Fay P.J., Beattie T., Huggins C.F., Regan L.M. (1994) Factor VIIIa A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site: *J Biol Chem.*; 269(32):20522-7.

Fels G., Grah K., Grah M. and Liesenfeld F.J. (1969) *Der Organismus: Eine Einführung in die biologischen Grundprobleme*

Fiedler K., Veit M., Stamnes M.A., Rothman J.E. (1996) Bimodal interaction of coatamer with the p24 family of putative cargo receptors: *Science*; 273(5280):1396-9.

Figueiredo M.S., Brownlee G.G. (1995) Cis-acting elements and transcription factors involved in the promoter activity of the human factor VIII gene: *J Biol Chem.*; 270(20):11828-38.

Foster P.A., Fulcher C.A., Houghten R.A., Zimmerman T.S. (1990) Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine: *Blood*; 75(10):1999-2004.

Friedlander R., Jarosch E., Urban J., Volkwein C., Sommer T. (2000) A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response: *Nat Cell Biol.*; 2(7):379-84.

Gething M.J. (1997) Protein folding. The difference with prokaryotes: *Nature*; 24;388(6640):329, 331.

Gething M.J., Blond-Elguindi S., Buchner J., Fourie A., Knarr G., Modrow S., Nanu L., Segal M., Sambrook J. (1995) Binding sites for Hsp70 molecular chaperones in natural proteins: Cold Spring Harb Symp Quant Biol.; 60:417-28.

Ginelli E., Corneo G. (1976) The organization of repeated DNA sequences in the human genome: Chromosoma; 56(1):55-68.

Gitschier J., Wood W.I., Goralka T.M., Wion K.L., Chen E.Y., Eaton D.H., Vehar G.A., Capon D.J., Lawn R.M. (1984) Characterization of the human factor VIII gene: Nature, 22-28;312(5992):326-30.

Glick B.S., Malhotra V. (1998) The curious status of the Golgi apparatus. Cell; 23;95(7):883-9.

Graham J.B., Barrow E.S., Roberts H.R., Webster W.P., Blatt P.M., Buchanan P., Cederbaum A.I., Allain J.P., Barrett D.A., Gralnick H.R. (1975) Dominant inheritance of hemophilia A in three generations of women: Blood 46(2):175-88.

Graham J.B., Buckwalter J.A., Hartley L.J. and Brinkhous K.M. (1949) Canine hemophilia: Observation on the course, the clotting anomaly and the effect of blood transfusions: J. Exp. Med., 90: 97-111.

Graw J., Erfle V. (1995) Virus-free preparations of factor VIII: Dtsch Med Wochenschr.; 120(7):221-4.

Gülow K., Bienert D., Haas I.G. (2002) BiP is feed-back regulated by control of protein translation efficiency: J Cell Sci.; 115(Pt 11):2443-52.

Haack A., Schmitt C., Poller W., Oldenburg J., Hanfland P., Brackmann H.H., Schwaab R. (1999) Analysis of expression kinetics and activity of a new B-domain truncated and full-length FVIII protein in three different cell lines: Ann Hematol.; 78(3):111-6.

Hamman B.D., Chen J.C., Johnson E.E., Johnson A.E. (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane: *Cell.*; 89(4):535-44.

Hanein D., Matlack K.E., Jungnickel B., Plath K., Kalies K.U., Miller K.R., Rapoport T.A., Akey C.W. (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation: *Cell.*; 87(4):721-32.

Harding H.P., Zhang Y., Ron D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase: *Nature*; 397(6716):271-4.

Hartl F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding: *Nature*; 381(6583):571-9.

Hauri H.P., Kappeler F., Andersson H., Appenzeller C. (2000) ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway: *J Cell Sci.*; 113 (Pt 4):587-96.

Healey J.F., Lubin I.M., Nakai H., Saenko E.L., Hoyer L.W., Scandella D., Lollar P. (1995) Residues 484-508 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the A2 domain of human factor VIII: *J Biol Chem.*; 270(24):14505-9.

Helenius A. (2001) Quality control in the secretory assembly line: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 356(1406):147-50.

Helenius A., Aeby M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans: *Science*; 291(5512):2364-9.

Higuchi M., Antonarakis S.E., Kasch L., Oldenburg J., Economou-Petersen E., Olek K., Arai M., Inaba H., Kazazian H.H. Jr. (1991) Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis: *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 88(19):8307-11.

Higuchi M., Kazazian H.H. Jr., Kasch L., Warren T.C., McGinniss M.J., Phillips J.A. 3rd, Kasper C., Janco R., Antonarakis S.E. (1991) Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene: *Proc Natl Acad Sci U S A*; 88(16):7405-9.

Hinnebusch A.G. (1994) The eIF-2 alpha kinases: regulators of protein synthesis in starvation and stress: *Semin Cell Biol.*; 5(6):417-26.

Hironaka T., Furukawa K., Esmon P.C., Fournel M.A., Sawada S., Kato M., Minaga T., Kobata A. (1992) Comparative study of the sugar chains of factor VIII purified from human plasma and from the culture media of recombinant baby hamster kidney cells: *J Biol Chem.*; 267(12):8012-20.

Hironaka T., Kato M., Sawada S., Minaga T. (1992) The carbohydrate structures of blood coagulation factor VIII: *Tanpakushitsu Kakusan Koso.*; 37(11 Suppl):1723-9.

Hoeben R.C., Fallaux F.J., Cramer S.J., van den Wollenberg D.J., van Ormondt H., Briet E., van der Eb A.J. (1995) Expression of the blood-clotting factor-VIII cDNA is repressed by a transcriptional silencer located in its coding region: *Blood*; 85(9):2447-54.

Hopff (1828) Über die Haemophilie oder die erbliche Anlage zu tödlichen Blutungen

Hoyer L.W. (1994) Hemophilia A: *N Engl J Med.*; 330(1):38-47.

Hoyer L.W., Scandella D. (1994) Factor VIII inhibitors: structure and function in autoantibody and hemophilia A patients: *Semin Hematol.*; 31(2 Suppl 4):1-5.

Ingram G.I.C. (1976) The history of haemophilia: *Journal of Clinical Pathology* 29: 469-479.

Jacquemin M., Lavend'homme R., Benhida A., Vanzieleghe B., d'Oiron R., Lavergne J.M., Brackmann H.H., Schwaab R., VandenDriessche T., Chuah M.K., Hoylaerts M., Gilles J.G., Peerlinck K., Vermynen J., Saint-Remy J.M. (2000) A novel cause of mild/moderate hemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor: *Blood*, 96(3):958-65.

Jenny R.J., Pittman D.D., Toole J.J., Kriz R.W., Aldape R.A., Hewick R.M., Kaufman R.J., Mann K.G. (1987) Complete cDNA and derived amino acid sequence of human factor V: *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 84(14):4846-50.

Kane W.H., Davie E.W. (1988) Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders: *Blood*; 71(3):539-55.

Kane W.H., Devore-Carter D., Ortel T.L. (1990) Expression and characterization of recombinant human factor V and a mutant lacking a major portion of the connecting region: *Biochemistry*; 29(29):6762-8.

Kaplan J.C., Kahn A., Chelly J. (1992) Illegitimate transcription: its use in the study of inherited disease: *Hum Mutat.*, 1(5):357-60.

Kappeler F., Klopfenstein D.R., Foguet M., Paccaud J.P., Hauri HP. (1997) The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII: *J Biol Chem.*; 272(50):31801-8.

Kassenbrock C.K., Kelly R.B. (1989) Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides: *EMBO J.*;8(5):1461-7.

Kaufman R.J. (1985) Identification of the components necessary for adenovirus translational control and their utilization in cDNA expression vectors: *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 82(3):689-93.

Kaufman R.J. (1989) Genetic engineering of factor VIII: *Nature*; 9;342(6246):207-8.

Kaufman R.J. (1991) Developing rDNA products for treatment of hemophilia A: Trends Biotechnol.; 9(10):353-9.

Kaufman R.J. (1992) Biological regulation of factor VIII activity: Annu Rev Med.;43:325-39.

Kaufman R.J. (1992) Expression and structure-function properties of recombinant factor VIII: Transfus Med Rev.; 6(4):235-46.

Kaufman R.J. (1997) DNA transfection to study translational control in mammalian cells: Methods; 11(4):361-70.

Kaufman R.J. (1997) Overview of vector design for mammalian gene expression: Methods Mol Biol.; 62:287-300.

Kaufman R.J. (1998) Post-translational modifications required for coagulation factor secretion and function: Thromb Haemost.; 79(6):1068-79.

Kaufman R.J. (2000) Overview of vector design for mammalian gene expression: Mol Biotechnol.; 16(2):151-60.

Kaufman R.J. (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease: J Clin Invest.; 110(10):1389-98.

Kaufman R.J. (2004) Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum: Trends Biochem Sci.; 29(3):152-8.

Kaufman R.J., Murtha P., Ingolia D.E., Yeung C.Y., Kellems R.E. (1986) Selection and amplification of heterologous genes encoding adenosine deaminase in mammalian cells: Proc Natl Acad Sci U S A.; 83(10):3136-40.

Kaufman R.J., Pipe S.W. (1999) Regulation of factor VIII expression and activity by von Willebrand factor: Thromb Haemost.; 82(2):201-8.

Kaufman R.J., Pipe S.W., Tagliavacca L., Swaroop M., Moussalli M. (1997) Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII: Blood Coagul Fibrinolysis; 8 Suppl 2:S3-14.

Kaufman R.J., Swaroop M., Murtha-Riel P. (1994) Depletion of manganese within the secretory pathway inhibits O-linked glycosylation in mammalian cells: Biochemistry; 33(33):9813-9.

Kaufman R.J., Wasley L.C., Dorner A.J. (1988) Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells: J Biol Chem.; 263(13):6352-62.

Kaufmann S.H. (1992) Heat shock proteins in health and disease: Int J Clin Lab Res.; 21(3):221-6.

Klausner R.D., Sitia R. (1990) Protein degradation in the endoplasmic reticulum: Cell; 62(4):611-4.

Klenchin V.A., Sukharev S.I., Serov S.M., Chernomordik L.V., Chizmadzhev Yu.A.. (1991) Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis: Biophys J.; 60(4):804-11.

Klopp N., Oldenburg J., Uen C., Schneppenheim R., Graw J. (2002) 11 hemophilia A patients without mutations in the factor VIII encoding gene: Thromb Haemost.; 88(2):357-60.

Koch-Brandt C. (1991) Glycoprotein synthesis and secretion: translation and targeting: Am Rev Respir Dis.; 144(3 Pt 2):S29-32.

Kohno K., Normington K., Sambrook J., Gething M.J., Mori K. (1993) The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum: Mol Cell Biol.; 13(2):877-90.

Kostova Z., Wolf D.H. (2003) For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection: EMBO J.; 22(10):2309-17.

Kozutsumi Y., Normington K., Press E., Slaughter C., Sambrook J., Gething M.J. (1989) Identification of immunoglobulin heavy chain binding protein as glucose-regulated protein 78 on the basis of amino acid sequence, immunological cross-reactivity, and functional activity: J Cell Sci Suppl.; 11:115-37.

Kozutsumi Y., Segal M., Normington K., Gething M.J., Sambrook J. (1988) The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins: Nature; 332(6163):462-4.

Kreuz W., Becker S., Lenz E., Martinez-Saguer I., Escuriola-Ettingshausen C., Funk M., Ehrenforth S., Auerswald G., Kornhuber B. (1995) Factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A: epidemiology of inhibitor development and induction of immune tolerance for factor VIII: Semin Thromb Hemost.; 21(4):382-9.

Kumar H.P., Hague C., Haley T., Starr C.M., Besman M.J., Lundblad R.L., Baker D. (1996) Elucidation of N-linked oligosaccharide structures of recombinant human factor VIII using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis: Biotechnol Appl Biochem.; 24 (Pt 3):207-16.

Lakich D., Kazazian H.H. Jr., Antonarakis S.E., Gitschier J. (1993) Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A: Nat Genet.; 5(3):236-41.

Langner K.D., Bird R.E., McCandliss R., Huber B., Amann E., Zettlmeissl G., Kupper H.A. (1988) Synthesis of biologically active deletion mutants of human factor VIII:C: Behring Inst Mitt.; (82):16-25.

Lanoix J., Ouwendijk J., Stark A., Szafer E., Cassel D., Dejgaard K., Weiss M, Nilsson T. Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1: J Cell Biol.; 155(7):1199-212.

Lapan K.A., Fay P.J. (1997) Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa: J Biol Chem.; 272(4):2082-8.

Lapan K.A., Fay P.J. (1998) Interaction of the A1 subunit of factor VIIIa and the serine protease domain of factor X identified by zero-length cross-linking: Thromb Haemost.; 80(3):418-22.

Lenting P.J., van de Loo J.W., Donath M.J., van Mourik J.A., Mertens K. (1996) The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX: J Biol Chem.; 271(4):1935-40.

Letourneur F., Gaynor E.C., Hennecke S., Demolliere C., Duden R., Emr S.D., Riezman H., Cosson P. (1994) Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum: Cell; 79(7):1199-207.

Leyte A., van Schijndel H.B., Niehrs C., Huttner W.B., Verbeet M.P., Mertens K., vanMourik J.A. (1991) Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor: J Biol Chem.;266(2):740-6.

Lin S.W., Lin S.R., Shen M.C. (1993) Characterization of genetic defects of hemophilia A in patients of Chinese origin: Genomics; 18(3):496-504.

Lollar P., Hill-Eubanks D.C., Parker C.G. (1988) Association of the factor VIII light chain with von Willebrand factor: J Biol Chem.; 25;263(21):10451-5.

Lutze, G. (1999) Wissenswertes zur Gerinnung: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Lynch C.M., Israel D.I., Kaufman R.J., Miller A.D. (1993) Sequences in the coding region of clotting factor VIII act as dominant inhibitors of RNA accumulation and protein production: Hum Gene Ther.; 4(3):259-72.

Marquette K.A., Pittman D.D., Kaufman R.J. (1995) A 110-amino acid region within the A1-domain of coagulation factor VIII inhibits secretion from mammalian cells: J Biol Chem.; 270(17):10297-303.

Marquette K.A., Pittman D.D., Kaufman R.J. (1995) The factor V B-domain provides two functions to facilitate thrombin cleavage and release of the light chain: Blood; 86(8):3026-34.

McGinniss M.J., Kazazian H.H. Jr, Hoyer L.W., Bi L., Inaba H., Antonarakis S.E. (1993) Spectrum of mutations in CRM-positive and CRM-reduced hemophilia A: Genomics; 15(2):392-8.

McGlynn L.K., Mueller C.R., Begbie M., Notley C.R., Lillicrap D. (1996) Role of the liver-enriched transcription factor hepatocyte nuclear factor 1 in transcriptional regulation of the factor VIII gene: Mol Cell Biol., (5):1936-45.

Mendell J.T., Sharifi N.A., Meyers J.L., Martinez-Murillo F., Dietz H.C. (2004) Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise: Nat Genet.; 36(10):1073-8.

Mertens K., Donath M.J., van Leen R.W., de Keyzer-Nellen M.J., Verbeet M.P., Klaasse Bos. J.M., Leyte A., van Mourik J.A. (1993) Biological activity of recombinant factor VIII variants lacking the central B-domain and the heavy-chain sequence Lys713-Arg740: discordant in vitro and in vivo activity: Br J Haematol.; 85(1):133-42.

Meulien P., Faure T., Mischler F., Harrer H., Ulrich P., Bouderbala B., Dott K., Sainte Marie M., Mazurier C., Wiesel M.L. (1988) A new recombinant procoagulant protein derived from the cDNA encoding human factor VIII: Protein Eng.; 2(4):301-6.

Mironov A., Colanzi A., Silletta M.G., Fiucci G., Flati S., Fusella A., Polishchuk R., Mironov A. Jr., Di Tullio G., Weigert R., Malhotra V., Corda D., De Matteis M.A., Luini A. (1997) Role of NAD⁺ and ADP-ribosylation in the maintenance of the Golgi structure: J Cell Biol.; 139(5):1109-18.

Molinari M., Helenius A. (2000) Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum: *Science*; 288(5464):331-3.

Morris J.A., Dorner A.J., Edwards C.A., Hendershot L.M., Kaufman R.J. (1997) Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins: *J Biol Chem.*; 272(7):4327-34.

Mosesson M.W., Fass D.N., Lollar P., DiOrio J.P., Parker C.G., Knutson G.J., Hainfeld J.F., Wall J.S. (1990) Structural model of porcine factor VIII and factor VIIIa molecules based on scanning transmission electron microscope (STEM) images and STEM mass analysis: *J Clin Invest.*; 85(6):1983-90.

Moussalli M., Pipe S.W., Hauri H.P., Nichols W.C., Ginsburg D., Kaufman R.J. (1999) Mannose-dependent endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment-53-mediated ER to Golgi trafficking of coagulation factors V and VIII: *J Biol Chem.*; 274(46):32539-42.

Naylor J., Brinke A., Hassock S., Green P.M., Giannelli F. (1993) Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions: *Hum Mol Genet.*; 2(11):1773-8.

Naylor J.A., Green P.M., Montandon A.J., Rizza C.R., Giannelli F (1991) Detection of three novel mutations in two haemophilia A patients by rapid screening of whole essential region of factor VIII gene: *Lancet*, 337(8742):635-9.

Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider PH. (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields: *EMBO J.*; 1(7):841-5.

Ng D.T., Spear E.D., Walter P. (2000) The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control: *J Cell Biol.*; 150(1):77-88.

Nichols W.C., Seligsohn U., Zivelin A., Terry V.H., Hertel C.E., Wheatley M.A., Moussalli M.J., Hauri H.P., Ciavarella N., Kaufman R.J., Ginsburg D. (1998) Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII: *Cell*; 93(1):61-70.

Nichols W.C., Terry V.H., Wheatley M.A., Yang A., Zivelin A., Ciavarella N., Stefanile C., Matsushita T., Saito H., de Bosch N.B., Ruiz-Saez A., Torres A., Thompson A.R., Feinstein D.I., White G.C., Negrier C., Vinciguerra C., Aktan M., Kaufman R.J., Ginsburg D., Seligsohn U. (1999) ERGIC-53 gene structure and mutation analysis in 19 combined factors V and VIII deficiency families: *Blood*; 93(7):2261-6.

Nogami K., Shima M., Hosokawa K., Nagata M., Koide T., Saenko E.L., Tanaka I., Shibata M., Yoshioka A. (2000) Factor VIII C2 domain contains the thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed cleavage at Arg1689: *J Biol Chem.*; 275(33):25774-80.

Nogami K., Shima M., Hosokawa K., Suzuki T., Koide T., Saenko E.L., Scandella D., Shibata M., Kamisue S., Tanaka I., Yoshioka A. (1999) Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa: *J Biol Chem.*; 274(43):31000-7.

Nogami K., Shima M., Nakai H., Tanaka I., Suzuki H., Morichika S., Shibata M., Saenko E.L., Scandella D., Giddings J.C., Yoshioka A. (1999) Identification of a factor VIII peptide, residues 2315-2330, which neutralizes human factor VIII C2 inhibitor alloantibodies: requirement of Cys2326 and Glu2327 for maximum effect: *Br J Haematol.*; 107(1):196-203.

Normington K., Kohno K., Kozutsumi Y., Gething M.J., Sambrook J. (1989) *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP: *Cell*; 57(7):1223-36.

O'Brien L.M., Medved L.V., Fay P.J. (1995) Localization of factor IXa and factor VIIIa interactive sites: *J Biol Chem.*; 270(45):27087-92.

Oldenburg J., Brackmann H.H., Hanfland P., Schwaab R. (2000) Molecular genetics in haemophilia A: Vox Sang; 78 Suppl 2:33-8.

Oldenburg J., Schroder J., Graw J., Ivaskevicius V., Brackmann H.H., Schramm W., Muller C.R., Seifried E., Schwaab R. (2003) Significance of mutation analysis in patients with haemophilia A: Hämostaseologie; 23(1):6-12.

Otto J.C. (1803) An account of an haemorrhagic disposition existing in certain families

Ou W.J., Cameron P.H., Thomas D.Y., Bergeron J.J. (1993) Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation: Nature; 364(6440):771-6.

Parodi A.J. (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation: Biochem J.; 348 Pt 1:1-13.

Pelham H.R. (1998) Getting through the Golgi complex: Trends Cell Biol.; 8(1):45-9.

Pemberton S., Lindley P., Zaitsev V., Card G., Tuddenham E.G., Kemball-Cook G. (1997) A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin: Blood; 89(7):2413-21.

Petäjä-Repo U.E., Hogue M., Laperriere A., Bhalla S., Walker P., Bouvier M. (2001) Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome: J Biol Chem.; 276(6):4416-23.

Petäjä-Repo U.E., Hogue M., Laperriere A., Walker P., Bouvier M. (2000) Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor: J Biol Chem.; 275(18):13727-36.

Peterson J.R., Ora A., Van P.N., Helenius A. (1995) Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins: *Mol Biol Cell.*; (9):1173-84.

Pipe S.W., Kaufman R.J. (1996) Factor VIII C2 domain missense mutations exhibit defective trafficking of biologically functional proteins: *J Biol Chem.*; 271(41):25671-6.

Pipe S.W., Kaufman R.J. (1997) Characterization of a genetically engineered inactivation-resistant coagulation factor VIIIa: *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 94(22):11851-6.

Pipe S.W., Morris J.A., Shah J., Kaufman R.J. (1998) Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin: *J Biol Chem.*; 273(14):8537-44.

Pittman D.D., Alderman E.M., Tomkinson K.N., Wang J.H., Giles A.R., Kaufman R.J. (1993) Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII: *Blood.*; 81(11):2925-35.

Pittman D.D., Kaufman R.J. (1988) Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII): *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 85(8):2429-33.

Pittman D.D., Kaufman R.J. (1989) Structure-function relationships of factor VIII elucidated through recombinant DNA technology: *Thromb Haemost.*; 61(2):161-5.

Pittman D.D., Kaufman R.J. (1993) Site-directed mutagenesis and expression of coagulation factors VIII and V in mammalian cells: *Methods Enzymol.*; 222:236-60.

Pittman D.D., Marquette K.A., Kaufman R.J. (1994) Role of the B domain for factor VIII and factor V expression and function: *Blood*; 84(12):4214-25.

Pittman D.D., Millenson M., Marquette K., Bauer K., Kaufman R.J. (1992) A2 domain of human recombinant-derived factor VIII is required for procoagulant activity but not for thrombin cleavage: *Blood*; 79(2):389-97.

Pittman D.D., Tomkinson K.N., Kaufman R.J. (1994) Post-translational requirements for functional factor V and factor VIII secretion in mammalian cells: *J Biol Chem.*; 269(25):17329-37.

Pittman D.D., Wang J.H., Kaufman R.J. (1992) Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII: *Biochemnistry*; 31(13):3315-25.

Plempner R.K., Wolf D.H. (1999) Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome: *Mol Biol Rep.*; (1-2):125-30.

Plempner R.K., Wolf D.H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease: *Trends Biochem Sci.*; 24(7):266-70.

Pratt K.P., Shen B.W., Takeshima K., Davie E.W., Fujikawa K., Stoddard B.L. (1999) Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution: *Nature*; 402(6760):439-42.

Precup J.W., Kline B.C., Fass D.N. (1991) A monoclonal antibody to factor VIII inhibits von Willebrand factor binding and thrombin cleavage: *Blood*; 77(9):1929-36.

Prostko C.R., Brostrom M.A., Malara E.M., Brostrom C.O. (1992) Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 alpha and inhibition of eIF-2B in GH3 pituitary cells by perturbants of early protein processing that induce GRP78: *J Biol Chem.*; 267(24):16751-4.

Rapoport T.A., Rolls M.M., Jungnickel B. (1996) Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane: *Curr Opin Cell Biol.*; 8(4):499-504.

Rosner F. (1969) Hemophilia in the Talmud and rabbinic writings: *Ann Intern Med.*; 70(4):833-7.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Sarver N., Ricca G.A., Link J., Nathan M.H., Newman J., Drohan W.N. (1987) Stable expression of recombinant factor VIII molecules using a bovine papillomavirus vector: DNA; 6(6):553-64.

Schneppenheim R., Budde U., Krey S., Drewke E., Bergmann F., Lechler E., Oldenburg J., Schwaab R. (1996) Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1: *Thromb Haemost.*; 76(4):598-602.

Schubert U., Anton L.C., Gibbs J., Norbury C.C., Yewdell J.W., Bennink J.R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes: *Nature*; 404(6779):770-4.

Stephens D.J., Pepperkok R. (2002) Imaging of procollagen transport reveals COPI-dependent cargo sorting during ER-to-Golgi transport in mammalian cells: *J Cell Sci.*; 115(Pt 6):1149-60.

Stoilova-McPhie S., Villoutreix B.O., Mertens K., Kembball-Cook G., Holzenburg A. (2002) 3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography: *Blood*; 99(4):1215-23.

Sukharev S.I., Klenchin V.A., Serov S.M., Chernomordik L.V., Chizmadzhev Yu.A. (1992) Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J.*; 63(5):1320-7.

Swaroop M., Moussalli M., Pipe S.W., Kaufman R.J. (1997) Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII: *J Biol Chem.*; 272(39):24121-4.

Tagliavacca L., Moon N., Dunham W.R., Kaufman R.J. (1997) Identification and functional requirement of Cu(I) and its ligands within coagulation factor VIII: J Biol Chem.; 272(43):27428-34.

Tagliavacca L., Wang Q., Kaufman R.J. (2000) ATP-dependent dissociation of non-disulfide-linked aggregates of coagulation factor VIII is a rate-limiting step for secretion: Biochemistry; 39(8):1973-81.

Tavassoli K., Eigel A., Wilke K., Pollmann H., Horst J. (1998) Molecular diagnostics of 15 hemophilia A patients: characterization of eight novel mutations in the factor VIII gene, two of which result in exon skipping: Hum Mutat.; 12(5):301-3.

Thompson A.R., Murphy M.E., Liu M., Saenko E.L., Healey J.F., Lollar P., Scandella D. (1997) Loss of tolerance to exogenous and endogenous factor VIII in a mild hemophilia A patient with an Arg593 to Cys mutation: Blood; 90(5):1902-10.

Toole J.J., Knopf J.L., Wozney J.M., Sultzman L.A., Buecker J.L., Pittman D.D., Kaufman R.J., Brown E., Showemaker C., Orr E.C. (1992) Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor: Biotechnology.; 24:310-5.

Toole J.J., Pittman D.D., Orr E.C., Murtha P., Wasley L.C., Kaufman R.J. (1986) A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity: Proc Natl Acad Sci U S A.; 83(16):5939-42.

Travers K.J., Patil C.K., Wodicka L., Lockhart D.J., Weissman J.S., Walter P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation: Cell; 101(3):249-58.

Tuddenham E.G., Schwaab R., Seehafer J., Millar D.S., Gitschier J., Higuchi M., Bidichandani S., Connor J.M., Hoyer L.W., Yoshioka A. (1994) Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, second edition: Nucleic Acids Res.; 22(17):3511-33.

Uen C., Oldenburg J., Schroder J., Brackmann H.J., Schramm W., Schwaab R., Schneppenheim R., Graw J. (2003) 2% Haemophilia A patients without mutation in the FVIII gene: *Hamostaseologie*; 23(1):1-5.

Vassilakos A., Cohen-Doyle M.F., Peterson P.A., Jackson M.R., Williams D.B. (1996) The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules: *EMBO J.*; 15(7):1495-506.

Vehar G.A., Keyt B., Eaton D., Rodriguez H., O'Brien D.P., Rotblat F., Oppermann H., Keck R., Wood W.I., Harkins R.N. (1984) Structure of human factor VIII: *Nature*; 312(5992):337-42.

Vehar G.A., Lawn R.M. (1986) The cloning of factor VIII and the genetics of hemophilia A: *Hosp Pract (Off Ed)*.21(5):111-6.

Vlot A.J., Koppelman S.J., Meijers J.C., Dama C., van den Berg H.M., Bouma B.N., Sixma J.J., Willems G.M. (1996) Kinetics of factor VIII-von Willebrand factor association: *Blood*.;87(5):1809-16.

Walter E.I., Roberts W.L., Rosenberry T.L., Ratnoff W.D., Medof M.E. (1990) Structural basis for variations in the sensitivity of human decay accelerating factor to phosphatidylinositol-specific phospholipase C cleavage: *J Immunol.*; 144(3):1030-6.

Walter P., Johnson A.E. (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane: *Annu Rev Cell Biol.*;10:87-119.

Wang X.Z., Harding H.P., Zhang Y., Jolicoeur E.M., Kuroda M., Ron D. (1998) Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses: *EMBO J.*; 17(19):5708-17.

Warren G., Malhotra V. (1998) The organisation of the Golgi apparatus: *Curr Opin Cell Biol.*; 10(4):493-8.

Webster W.P., Mandel S.R, Reddick R.L, Wagner J.L, Penick G.D. (1974) Orthotopic liver transplantation in canine hemophilia B: *Am J Physiol.*, 226(3):496-500.

Wion K.L., Kelly D., Summerfield J.A., Tuddenham E.G., Lawn R.M. (1985) Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues: *Nature*, 317(6039):726-9.

Wise R.J., Ewenstein B.M., Gorlin J., Narins S.C., Jesson M., Handin R.I. (1993) Autosomal recessive transmission of hemophilia A due to a von Willebrand factor mutation: *Hum Genet.*; 91(4):367-72.

Wood W.I. (1986) Expression of cloned human factor VIII and the molecular basis of gene defects that cause hemophilia: *Prog Clin Biol Res.*, 211:297-302.

Wood W.I., Capon D.J., Simonsen C.C., Eaton D.L., Gitschier J., Keyt B., Seeburg P.H., Smith D.H., Hollingshead P., Wion K.L. (1984) Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones: *Nature*, 312(5992):330-7.

Yonemura H., Sugawara K., Nakashima K., Nakahara Y., Hamamoto T., Mimaki I., Yokomizo K., Tajima Y., Masuda K., Imaizumi A. (1993) Efficient production of recombinant human factor VIII by co-expression of the heavy and light chains: *Protein Eng.*; 6(6):669-74.

Zhang B., Cunningham M.A., Nichols W.C., Bernat J.A., Seligsohn U., Pipe S.W., McVey J.H., Schulte-Overberg U., de Bosch N.B., Ruiz-Saez A., White G.C., Tuddenham E.G., Kaufman R.J., Ginsburg D. (2003) Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex: *Nat Genet.*; 34(2):220-5.

Zhang B., Ginsburg D. (2004) Familial multiple coagulation factor deficiencies: new biologic insight from rare genetic bleeding disorders: *J Thromb Haemost.*; 2(9):1564-72.

Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Rainer Schwaab für die Übernahme der Betreuung dieser Promotionsarbeit und für die vielen anregenden Diskussionen und die ausgiebige fachliche Unterstützung während dieser Arbeit.

Für die Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Prof. Dr. J. Höhfeld.

Bei Herrn PD Dr. Oldenburg möchte ich mich ganz besonders für die Überlassung des Themas, die Konzeption der Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die vielen Diskussionen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hanfland danke ich für die Erlaubnis, diese Promotionsarbeit an seinem Institut anfertigen zu dürfen.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Saint-Remy der Universität Leuven danke ich für die Hilfe bei dem Erlernen der Techniken und für die nette Integration in die Arbeitsgruppe während des halben Jahres in Belgien.

Herrn Dr. Torsten Tonn danke ich für die Bereitstellung des Expressionsvektors.

Bei den Mitarbeiterinnen des Hämophilie-Labors möchte ich mich ganz herzlich für die sorgfältigen Durchführungen der FVIII-Aktivitätsmessungen bedanken.

Allen Mitarbeitern der Bonner Arbeitsgruppe, besonders Frau Heike Singer und Frau Claudia Klein, möchte ich ganz herzlich für die Hilfe bei den Sequenzierungen und Zell-Arbeiten, sowie für zahlreich anregende Gespräche und gute Zusammenarbeit danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Sören Tent für seine Unterstützung während der letzten 4 Jahre bedanken.